

Chlorose in *Synechococcus elongatus* PCC 7942:

Untersuchung des Response Regulators NblR und des Transkriptionsfaktors NtcA

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)**

vorgelegt von
Diplom-Biologin Grit Rasch
aus Dresden

angefertigt im Fachbereich Biologie und Chemie am
Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie an der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Peter Schreiner

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Forchhammer
Institut für Mikrobiologie/Organismische Interaktionen
Eberhard-Karls-Universität Tübingen

2. Gutachter: Prof. Dr. Annegret Wilde
Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Cyanobakterien – Verbreitung und ökologische Bedeutung	1
1.2. Photosynthese	1
1.2.1. Photosynthesepigmente der Cyanobakterien	3
1.3. Stickstoff-Assimilation in Cyanobakterien	4
1.4. Proteine – variable Makromoleküle und Voraussetzung für das regulatorische Potential in Cyanobakterien	6
1.4.1. Cyanobakterielle Zwei-Komponenten-System Proteine	7
1.4.1.1. Response Regulatoren	8
Klasse I-CheY Gruppe	8
Klasse II	9
OmpR-Typ Response Regulator	
Klasse III und IV	9
1.4.2. Regulation des Stickstoff-Metabolismus in Cyanobakterien	9
1.4.2.1. Das Signaltransduktionsprotein PII	10
1.4.2.2. Transkriptionskontrolle durch NtcA	11
1.5. Cyanobakterielle Anpassung an generellen und spezifischen Nährstoffmangel	13
1.6. Zielsetzung dieser Arbeit	16

Abschnitt A Charakterisierung der DNA-Bindungseigenschaften von NtcA

2. Material und Methoden	20
2.1. Bakterienstämme und Kultivierungsbedingungen	20
2.2. Herstellung der Plasmide	20
2.3. Überexpression von NtcA in <i>E. coli</i> BL21-Zellen	20
2.4. Aufreinigung von rekombinantem NtcA aus <i>E. coli</i> Extrakten	21
2.5. Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR (<i>site directed mutagenesis</i>)	22
2.6. Protein-DNA Interaktionsstudien	24
2.6.1. Retardierungsanalyse	24
2.6.1.1. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	24
2.6.1.2. Gel-Retardierungsansatz	25
2.6.2. Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse (Biacore)	25

2.6.2.1. Herstellung biotinylierter DNA	26
2.6.2.2. Vorbereiten und Beladen eines neuen Chips	27
2.6.2.3. Protein-DNA-Bindungsanalyse (Standardprozedur)	27
3. Ergebnisse	28
3.1. Abhängigkeit der DNA-Bindungseigenschaften von NtcA von Pufferbedingungen	28
3.2. Spezifität der Bindung von NtcA an verschiedene Promotor-Fragmente	33
3.3. α -Ketoglutarat Effekt auf die Bindungsspezifität von NtcA	39
3.4. Wirkung von PipX auf die Bindung von NtcA	41
4. Diskussion	43

Abschnitt B Transkriptom-Analyse von *Synechococcus elongatus* PCC 7942

Wildtyp im Vergleich zur NblR-, NtcA-, und PipX-Mutante während Stickstoffmangel

2. Material und Methoden	48
2.1. Cyanobakterienstämme, Kultivierungsbedingungen und Ernte	48
2.2. Herstellung der Deletions-Mutanten	48
2.3. Isolierung der Gesamt-RNA aus <i>S. elongatus</i> Wildtyp und NblR-, NtcA- und PipX-Mutanten	49
2.4. Mikroarray und Mikroarray-Datenanalyse	49
2.5. Nachweis eines polycistronischen Transkripts des <i>nsi5</i> -Operons	49
2.6. Oberflächen-Plasmon-Resonanz Analyse (Biacore)	50
3. Ergebnisse und Diskussion.....	51
3.1. Experimentelles Design	51
3.2. Unterschiede im Transkriptom der NblR-Mutante und der NtcA-Mutante im Vergleich zum Wildtyp unter Standardwachstumsbedingungen	52
3.2.1. NtcA-Mutante	52
A) Stickstoff-Metabolismus	52
B) Kohlenstoff-Metabolismus und Respiration	53
C) Circadiane Rhythmik	56
3.2.2. NblR-Mutante	56
A) Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus	56

B) Photosyntheseapparat	56
3.3. Unterschiede im Transkriptom des Wildtyps im Vergleich zur NblR-, NtcA- und PipX-Mutante unter Stickstoffmangelbedingungen	60
3.3.1. Numerische Übersicht über die Anzahl der regulierten Gene im Transkriptom des Wt, der NblR-, NtcA- und PipX-Mutante	60
3.3.2. Gene für Proteine des Stickstoff-Stoffwechsels	61
3.3.3. Gene für Proteine des Kohlenstoff-Metabolismus und Pilus-Apparates	65
3.3.4. Gene für Proteine des Energiestoffwechsels	67
3.4. Transkriptom-Analyse der NtcA-Mutante im Vergleich zum Wt und der NblR-Mutante im Vergleich zum Wt	70
3.5. Analyse der Gene der im <i>S. elongatus</i> Wt am höchsten induzierten Gene im Stickstoffmangel	71
3.5.1. Nachweis eines polycistronischen Transkripts der Gene <i>nsi5</i> , <i>merR</i> , <i>2150</i> , <i>2149</i> und <i>2148</i>	72
3.5.2. Sequenzvergleiche	73
3.5.3. Nachweis der Bindung von NtcA an den <i>nsi5</i> -Promotorbereich	74
3.5.4. Inaktivierung der Gene <i>nsi5</i> , <i>merR</i> , <i>2150</i> , <i>2149</i> und <i>2148</i>	75
3.5.5. Physiologische Untersuchung der Mutanten des <i>nsi5</i> Operons	76
4. Zusammenfassung NtcA und PipX-Mutante	79
5. Zusammenfassung NblR-Mutante	81

Abschnitt C Charakterisierung des globalen *Response Regulators* NblR bei Stickstoff- und Schwefelmangel in *Synechococcus elongatus* PCC 7942

2. Material und Methoden	92
2.1. Bakterienstämme	92
2.1.1. Cyanobakterien	92
2.1.2. <i>Escherichia coli</i>	92
2.2. Kultivierungsbedingungen	93
2.2.1. Kulturmedien zur Anzucht von Cyanobakterien	93
2.2.2. Kulturmedien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	94
2.2.3. Anzucht und Kultivierungsbedingungen von Cyanobakterien	94
2.2.4. Induktion von Stress (Stickstoffmangel, Schwefelmangel)	95
2.2.5. Regenerationsfähigkeit von <i>S. elongatus</i> Zellen	95

2.2.6. Anzucht von <i>E. coli</i> Zellen	95
2.3. Zellernte für RNA-Isolierung und Proteinanalysen	95
2.4. Molekularbiologische Techniken	96
2.4.1. Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. elongatus</i> Zellen	96
2.4.2. Isolierung von Plasmid-DNA	96
2.4.3. Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>S. elongatus</i> Zellen	97
2.4.3.1. RNA-Isolierung modifiziert nach Qiagen	97
2.4.3.2. RNA-Isolierung modifiziert nach Roche	98
2.4.4. Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion	99
2.4.4.1. Ganz-Zell-PCR aus <i>S. elongatus</i> Zellen	100
2.4.4.2. Ganz-Zell-PCR aus <i>E. coli</i> Zellen	100
2.4.4.3. Semi-quantitative RT-PCR	101
2.4.5. Herstellung der Deletions-Mutanten	101
2.4.6. Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration	104
2.4.7. Agarosegelelektrophorese	104
2.4.8. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	104
2.4.9. Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren	105
2.4.10. Transformation	105
2.4.10.1. Transformation von <i>S. elongatus</i> Zellen	105
2.4.10.2. Transformation von <i>E. coli</i> Zellen	106
2.4.11. Konstruktion des NblR-Expressionsplasmids	106
2.4.12. Überexpression und Aufreinigung von rekombinantem NblR in <i>E. coli</i> BL21-Zellen	107
2.5. Analytische Methoden	107
2.5.1. Bestimmung der Lichtintensität	107
2.5.2. Bestimmung der Zelldichte	107
2.5.3. Bestimmung der Proteinkonzentration	108
2.5.4. Pigmentanalyse in Cyanobakterien	108
2.5.5. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mit Hilfe der Poly- Acrylamid-Gelelektrophorese	108
2.5.5.1. Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) ...	108
2.5.5.2. Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Schägger und von Jagow	109
2.5.5.3. Elektrophorese unter nativen Bedingungen	110

2.5.6. Analytische 2D-Gelelektrophorese mit L-[S ³⁵] Methionin markierten	
Proben	110
2.5.6.1. Herstellung der Proben und Probenaufbereitung	110
2.5.6.2. 2D-Gelelektrophorese	111
2.6. Chromatographische Methoden	113
2.6.1. Bestimmung des Molekulargewichtes	113
2.6.1.1. Eichung der Gelfiltrationssäule	113
2.6.1.2. Gelfiltration von Proteinen	114
2.7. Färbung von Polyacrylamidgelen	114
2.7.1. Coomassie-Färbung	114
2.7.2. Silberfärbung nach Blum (1987)	115
2.8. Immunologische Methoden	116
2.8.1. Immunoblotanalyse	116
2.8.2. Dot Blot Analyse	117
2.9. Northern Blot Analyse	118
2.9.1. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	118
2.9.2. RNA-Isolierung und Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese	118
2.9.3. Northerntransfer	119
2.9.4. Hybridisierung	120
2.10. Protein-DNA-Interaktionsstudien	120
2.10.1. Gel-Retardierungs-Analyse	120
2.10.2. Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse (Biacore)	121
2.11. Chlorophyll Fluoreszenz-Messungen anhand eines PAM-Fluorometers	121
2.11.1. Chlorophyll-Fluoreszenz als Indikator photosynthetischer	
Reaktionen	121
2.11.2. Das Messprinzip des Pulse-Amplituden-Modulation (PAM)-	
Fluorometers	123
2.12. Mikroskopie von Cyanobakterien	124
3. Ergebnisse	125
3.1. Physiologische Charakterisierung der <i>S. elongatus</i> NbIR-Mutante	125
3.2. Phänotypische Charakterisierung der <i>S. elongatus</i> Zellen unter Stickstoffmangel	
(Chlorose)	125
3.3. Gesamtproteinmuster von Wildtyp- und NbIR-Zellen während der ersten Phase der	
Chlorose	133

3.4. Analyse des D1 Proteins des Photosystems II	135
3.5. Phänotypische Charakterisierung der <i>S. elongatus</i> Zellen unter Schwefelmangel	136
3.6. Gen-Expressionsanalyse während Stickstoff- und Schwefelmangel	140
3.7. Aufreinigung von rekombinanten NblR aus <i>E. coli</i>	143
3.8. Bestimmung des Molekulargewichtes	144
3.8.1. Eichung der Gelfiltrationssäule	144
3.8.2. Bestimmung des Molekulargewichtes von NblR	144
3.9. NblR-Protein im Wildtyp unter Standardwachstumsbedingungen und im Stickstoffmangel	146
3.10. Unterschiede im Transkriptom der NblR-Mutante im Vergleich zum Wildtyp im Stickstoffmangel	146
3.11. NblR-Bindungsanalysen an <i>nblA</i> - und <i>nsi5</i> -Promotor-DNA-Fragmente	148
3.11.1. Gel-Retardierungsanalyse	148
3.11.2. Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Biacore)	150
Bindungsanalysen mit NblR	
4. Diskussion	152
5. Zusammenfassung	159
6. Literaturverzeichnis	161
7. Abkürzungsverzeichnis	177

1. Einleitung

1.1. Cyanobakterien – Verbreitung und ökologische Bedeutung

Cyanobakterien sind Mikroorganismen, die zu den Gram-negativen Bakterien gehören. Sie zeichnen sich vor allen anderen Bakterien durch ihre Fähigkeit zur oxygenen Photosynthese aus, bei der Sauerstoff wie in den Chloroplasten eukaryotischer Pflanzen entsteht. Im Reich der Eubacteria nehmen die Cyanobakterien ein eigenes Phylum ein. Sie sind weltweit in Süß-, Brack- und Salzwasser sowie überall im Boden verbreitet. Aufgrund ihres besonderen Stoffwechsels (Photosynthese, Stickstofffixierung) und ihrer Fähigkeit, über lange Perioden Trockenheit und Kälte sowie sehr hohe Temperaturen zu ertragen, können sie auch in Grenzbiotopen extreme Standorte besiedeln (Whitton & Potts, 2000). Darüber hinaus gibt es vielfältige Cyanobakterien-Symbiosen, in denen die Cyanobakterien ihren Wirt mit Photosynthese-Assimilaten und/oder mit Stickstoff versorgen.

Cyanobakterien sind uralte Organismenformen, die wahrscheinlich für die erste Anreicherung der Erdatmosphäre mit Sauerstoff verantwortlich sind (ab etwa 2,6 Mrd. Jahren) (Brasier *et al.*, 2004). Nach der Endosymbiontentheorie waren die Vorfahren der heutigen Cyanobakterien die Vorläufer der Chloroplasten Höherer Pflanzen (Cavalier-Smith, 1975). Aufgrund ihrer weiten Verbreitung und ihres Metabolismus spielen die Cyanobakterien eine dominante Rolle im globalen Stickstoff- und Kohlenstoffzyklus.

In dieser Arbeit wurde mit dem einzelligen obligaten photoautotrophen Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (*S. elongatus*) gearbeitet. *S. elongatus* war das erste Cyanobakterium bei dem eine Transformation mit freier DNA gezeigt werden konnte (Shestakov & Khyen, 1970). Das Genom hat eine Größe von ca. 2,7 Mbp (Kaneko *et al.*, 1996a). Weiterhin wurden zwei Plasmide (ca. 8 und 46 kb) sequenziert (GenBank NCBI Nummer: S89470 und AF441790).

1.2. Photosynthese

In der oxygenen Photosynthese wird Lichtenergie genutzt, um durch Wasseroxidation Reduktionsäquivalente ($\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$) sowie Energieäquivalente (ATP) zu bilden. Zur Generierung von ATP trägt sowohl der lineare Elektronentransport als auch der zyklische

Elektronentransport bei. Der oxygene Photosyntheseapparat ist in einem intracytoplasmatischen Membransystem, der Thylakoidmembran lokalisiert (Krogmann, 1973). Die Komponenten der photosynthetischen Elektronentransportkette sind Photosystem II (PS II), Plastochinon, Cytochrom b_6/f -Komplex, Plastocyanin oder Cytochrom c553 (je nach Verfügbarkeit von Kupfer), Photosystem I (PS I), Ferredoxin und Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase (FNR) (Vermaas, 2001) (siehe Abb. 1). Das wasserspaltende System liegt an der Lumenseite der Thylakoide mit einem Mangan-Cluster verbunden. Im linearen photosynthetischen Elektronentransport nutzt das PS II die Lichtenergie, um Elektronen aus der Wasserspaltung auf Plastochinon (PQ), das in der Membran liegt, zu übertragen. Die Elektronen werden über den Cytochrom b_6/f -Komplex an den auf der Lumenseite lokalisierten *carrier* Plastocyanin (PC) weitergegeben. Das oxidierte Reaktionszentrum von PS I nimmt die Elektronen von dem *carrier* auf und gibt diese durch eine erneute Anregung durch Licht an das Akzeptor-Chlorophyll A0 ab. Die Elektronen werden weiter über A1, Eisen-Schwefel-Cluster schließlich auf Ferredoxin (Fd) übertragen (siehe Abb. 1). Durch die membrangebundene FNR wird im letzten Schritt NADP⁺ reduziert. Der durch das PS II sowie den Cytochrom b_6/f -Komplex und PS I Transmembran entstandene elektrochemische Protonengradient wird zur Synthese von ATP durch die ATP-Synthase genutzt.

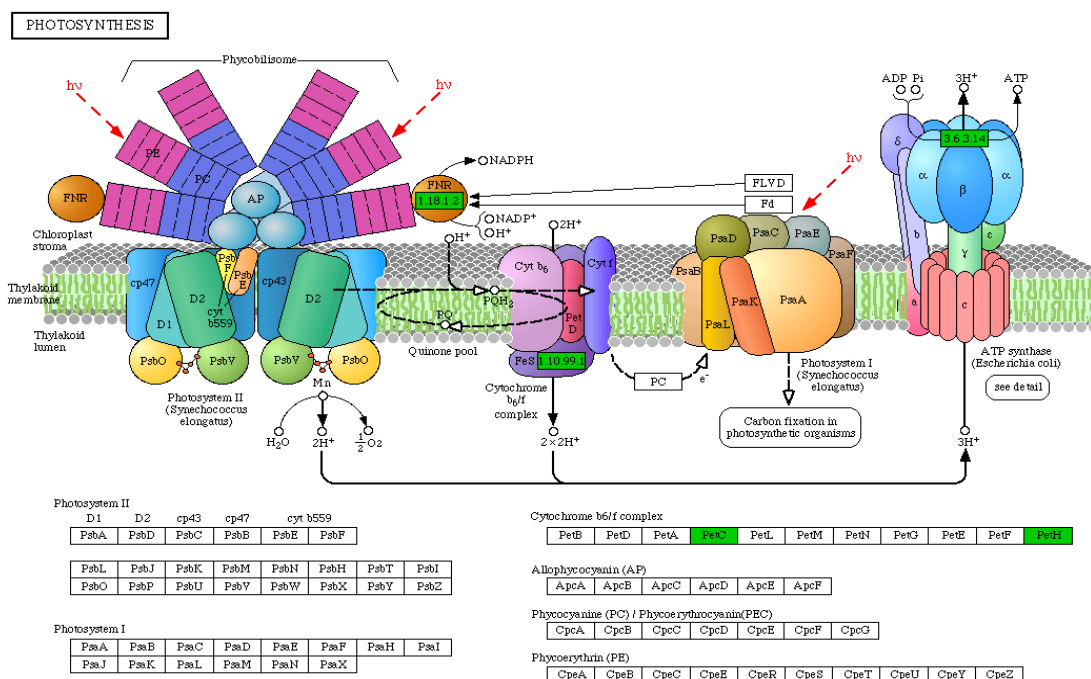


Abbildung 1 Darstellung des Photosyntheseapparates der Cyanobakterien. Gezeigt werden die Komponenten des Elektronentransportes und die Phycobilisomen. Die Abbildung wurde dem DOE Joint Genome Institute [<http://www.jgi.doe.gov/>] entnommen.

1.2.1. Photosynthesepigmente der Cyanobakterien

Die effektive Absorption des Lichtes durch Antennenpigmente ist der erste entscheidende Schritt der Photosynthese. Bei Cyanobakterien und Rotalgen dienen als Antennenpigmente sogenannte Phycobilisomen (PBS), die an der Stromaseite der Thylakoide aufgelagert sind (Bryant, 1994; Glazer, 1984). Diese Pigmente leiten die Anregungsenergie des Lichtes an die Chlorophyll a-Moleküle der Reaktionszentren weiter. Die PBS bestehen aus folgenden Phycobiliproteinen: Phycocyanin, Allophycocyanin und, bei manchen Arten auch aus Phycoerythrin, die kovalent mit offenkettigen Tetrapyrrolen zu Chromoproteinen verknüpft sind. Die Phycobilisomen sind von außen nach innen so aufgebaut, dass die niedrigeren Wellenlängen absorbierenden Phycoerythrine (ca. 570 nm) außen, dann die Phycocyanine (ca. 620 nm) und die Allophycocyanine im Inneren liegen (siehe Abb. 2), da sie das Licht größerer Wellenlängen (ca. 650 nm) absorbieren (Grossman *et al.*, 1993a). Die Zusammensetzung richtet sich nach den jeweiligen Lichtverhältnissen (Grossman *et al.*, 1993a; Lönneborg *et al.*, 1985). Durch diese chromatische Adaptation können Cyanobakterien ihre Photosynthese an verschiedene Lichtverhältnisse anpassen (Bogorad, 1975; Grossman, 1990; Tandeau de Marsac 1983). Unter Schwachlichtbedingungen dient zur optimalen Lichtnutzung die schnelle *state transition*, bei der die mobilen PBS die Energieverteilung zwischen PS I und PS II regulieren (Mullineaux *et al.*, 1997; Mullineaux & Emlyn-Jones, 2005; van Thor *et al.*, 1998). Die Phycobilisomen von *S. elongatus* bestehen aus den Phycobiliproteinen Allophycocyanin und Phycocyanin (siehe Abb. 2, B markiert).

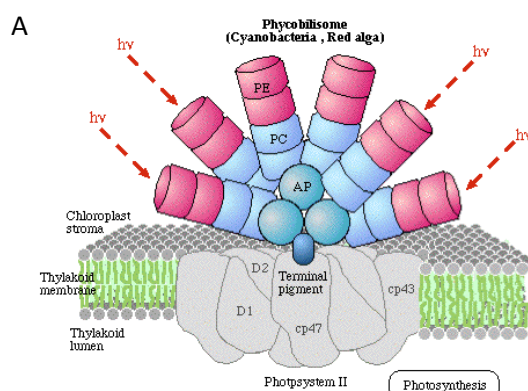


Abbildung 2 A) Schematische Darstellung eines Phycobilisoms, in dessen Zentrum Allophycocyanin (AP) liegt, über dem sich die anderen Phycobiliproteine befinden. PC = Phycocyanin, PE = Phycoerythrin. B) Im *S. elongatus* Genom vorhandene Gene der Proteine der Phycobilisomen sind grün hinterlegt. Abbildung entnommen der KEGG Pathway Database [<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html>].

1.3. Stickstoff-Assimilation in Cyanobakterien

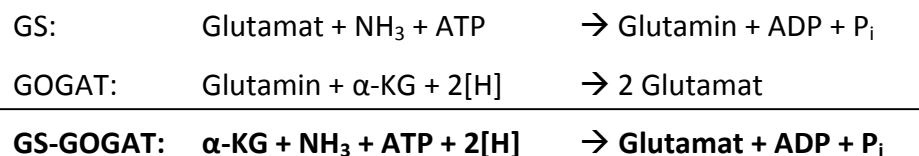
Die am häufigsten verwendeten Stickstoffquellen der Cyanobakterien sind Nitrat, Ammonium, Harnstoff und molekularer Stickstoff (Flores & Herrero, 1994). *S. elongatus* ist nicht in der Lage molekularen Stickstoff zu fixieren oder Harnstoff als N-Quelle zu verwenden (Luque & Forchhammer, 2008). Jedoch kann aus Cyanat Ammonium gewonnen werden (Harano *et al.*, 1997; Miller & Espie, 1994). Sowohl in *S. elongatus* als auch in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*) wurde eine hohe Cyanase-Aktivität nachgewiesen. In *S. elongatus* liegt das für die Cyanase codierende Gen *cynS* in einem Cluster mit drei weiteren Genen *cynABD*, die Homologien zu einem ABC-Transporter aufweisen (Espie *et al.*, 2007).

Nitrat ist die an vielen Standorten am häufigsten vorkommende gebundene Stickstoffquelle in der Natur und muss über einen aktiven Transport in die Zellen aufgenommen werden. In *S. elongatus* und *Anabaena* sp. PCC 7120 erfolgt die Nitrat/Nitrit Aufnahme über einen hochaffinen ABC-Transporter aus den Genprodukten *nrtA*, *nrtB*, *nrtC* und *nrtD* (Cai & Wolk, 1997; Frías *et al.*, 1997; Maeda & Omata, 1997; Omata *et al.*, 1993). Die Aufnahme wird durch die Anwesenheit von Ammonium inhibiert (Flores *et al.*, 1980). Diese für den Transport codierenden Gene befinden sich in *S. elongatus* mit der Nitrat-Reduktase (*nirA*) (Luque *et al.*, 1993) und der Nitrat-Reduktase (*narB*) (Rubio *et al.*, 1996) in einem Operon (*nirA-nrtABCD-narB* Operon) (Frías *et al.*, 1997; Luque *et al.*, 1992; Omata *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1993).

Ammonium ist die bevorzugte Stickstoffquelle der Cyanobakterien, da es intrazellulär direkt über den GS-GOGAT Zyklus assimiliert werden kann. Ammoniak (NH_3) kann direkt durch die Membranen diffundieren, während Ammonium (NH_4^+) in die Zelle transportiert wird. Auch in submicromolaren Konzentrationen ($< 1 \mu\text{M}$) wird Ammonium über hochaffine Ammonium/Methylammonium-Permeasen assimiliert (Muro-Pastor *et al.*, 2005). In *Synechocystis* konnten drei *amt*-Gene identifiziert werden (*amt1-3*), die bei hohen Ammoniumkonzentrationen reprimiert werden (Kaneko *et al.*, 1996b; Montesinos *et al.*, 1998). In *S. elongatus* konnte neben dem *amt1* Gen (Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002b) noch ein weiteres *amtB* Gen (Paz-Yepes *et al.*, 2007) identifiziert werden.

Nitrat und Nitrit werden intrazellulär durch die Nitrat- (NR) und Nitrit-Reduktase (NiR) zu Ammonium reduziert (Guerrero *et al.*, 1981; Luque *et al.*, 1994). Zunächst katalysiert die NR die Reduktion von Nitrat zu Nitrit unter Verwendung von zwei Elektronen. Im nächsten Schritt wird Nitrit durch die NiR mit Hilfe von sechs Elektronen zu Ammonium reduziert. Der Elektronendonator für beide Enzyme ist reduziertes Ferredoxin aus dem PS I (Flores *et al.*, 2005).

Aufgenommenes oder intrazellulär produziertes Ammonium wird in Cyanobakterien über den Glutamin-Synthetase – Glutamat-Synthase Zyklus (GS-GOGAT) assimiliert (Meeks *et al.*, 1977; Wolk *et al.*, 1976). Die Glutamin-Synthetase (GS) ist das Schlüsselenzym der Ammonium-Assimilation. Unter ATP Verbrauch wird Ammonium auf die γ -Carboxylgruppe des Glutamats transferiert. Die Amidogruppe des entstandenen Glutamins wird durch die Glutamat-Synthase (GOGAT) auf α -Ketoglutarat übertragen (siehe Gleichung unten). Dabei entstehen zwei Moleküle Glutamat, wovon ein Molekül durch die GS wieder amidiert wird. Pro gebildetes Molekül Glutamat werden zwei Elektronen benötigt. Diese werden vom reduzierten Ferredoxin aus der Photosynthese (PS I) bereitgestellt (Marqués *et al.*, 1992). Das Kohlenstoffgerüst α -Ketoglutarat wird aus dem Citrat-Zyklus der Kohlenstofffixierung zur Verfügung gestellt.



Cyanobakterien besitzen nur einen unvollständigen Citrat-Zyklus, da ihnen das Enzym α -Ketoglutarat-Dehydrogenase fehlt (Pearce *et al.*, 1969; Stanier & Cohen-Bazire, 1977). Somit ist die Synthese von α -Ketoglutarat aus Isocitrat durch die Isocitrat-Dehydrogenase (IDH, *icd*-Gen) der Endschrift des oxidativen Astes des Citratzyklus. α -Ketoglutarat kommt somit ausschließlich eine anabolische Funktion als Kohlenstoffgerüst für die Assimilation von Ammonium durch den GS-GOGAT Zyklus zu, dient somit als Schnittstelle zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus und ist dadurch ein Maß für das Verhältnis zwischen C- und N-Assimilation.

Mit Ausnahme von *Pseudoanabaena* sp. PCC 6903 besitzen alle Cyanobakterien die Glutamin-Synthetase vom Typ I (GS Typ I), die durch *glnA* codiert wird (Crespo *et al.*,

1998; Muro-Pastor *et al.*, 2005). Einige nicht-diazotrophe Stämme enthalten eine weitere GS des Typs III, kodiert durch das *glnN*-Gen (Reyes & Florencio, 1994; Sauer *et al.*, 2000). In *Synechocystis* konnte gezeigt werden, dass die GS-Aktivität auf transkriptionaler (siehe unten) und post-translationaler Ebene über Protein-Protein Interaktion mit den Inaktivierungsfaktoren IF7 und IF17 reguliert werden (Garcia-Dominguez *et al.*, 1999). Die Inaktivierungsfaktoren werden durch die Gene *gifA* und *gifB* codiert und stehen unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors NtcA (siehe unten).

1.4. Proteine – variable Makromoleküle und Voraussetzung für das regulatorische Potential in Cyanobakterien

Proteine gewährleisten und steuern den Ablauf von Prozessen, ohne die eine Existenz lebender Zellen nicht denkbar wäre. Dabei spielt auch die Weiterleitung von extrazellulären Signalen oder intrazellulären Informationen eine wichtige Rolle (Signaltransduktion). Diese und eine Vielzahl weiterer Aufgaben, die durch Proteine erfüllt werden, erfordern eine hoch spezifische Wirkungsweise. Die notwendige Spezifität kann durch Veränderungen der Proteinstruktur erreicht werden. Posttranslationale Modifikationen stellen eine Möglichkeit dar, die Aktivitäten und Funktionen von Proteinen zu verändern. Die in der Regel durch andere Proteine vorgenommenen Veränderungen können von Phosphorylierungen und Adenylierungen an Aminosäureseitenketten, bis hin zur Abspaltung von Signalpeptiden reichen (Walsh, 2005). Bis heute sind über 300 verschiedene Arten posttranslationaler Proteinmodifikationen bekannt (Lottspeich *et al.*, 2006). Eine weit verbreitete, an der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse beteiligte, posttranslationale Modifikation ist die Proteinphosphorylierung.

Proteinkinasen katalysieren die Phosphorylierung von Aminosäureseitenketten unter Verwendung des γ -Phosphats von ATP oder GTP. Proteinphosphatasen können das gebundene Phosphat wieder hydrolysieren und somit die Phospho-Proteine wieder in ihren Ausgangszustand zurückversetzen.

In Proteinen werden hauptsächlich die Aminosäuren Serin (Ser), Threonin (Thr) und Tyrosin (Tyr) an einer Hydroxylgruppe phosphoryliert. Aber auch die Aminosäuren Histidin, Arginin, Cystein, Glutamat und Aspartat können phosphoryliert werden (Walsh,

2005). Bei Zwei-Komponenten-Systemen, die der Signaltransduktion dienen, werden konservierte Histidin- bzw. Aspartatrete phosphoryliert.

In Cyanobakterien gehören die Ser/Thr und Tyr Kinasen und Phosphatasen zu den wichtigen regulatorischen Proteinen, die u. a. an der Regulation des Stickstoff- und Kohlenstoff-Metabolismus, der Photosynthese und Stressreaktion beteiligt sind (Zhang *et al.*, 2005). Bei Veränderungen der Umweltbedingungen und des Stoffwechsels der Cyanobakterien spielt auch die Signaltransduktion über Zwei-Komponenten-System Proteine eine wichtige Rolle.

1.4.1. Cyanobakterielle Zwei-Komponenten-System Proteine

Cyanobakterien sind einer Vielzahl von Umwelteinflüssen ausgesetzt, welche mittels Signaltransduktion wahrgenommen und ins Zellinnere geleitet werden, wodurch eine Zellantwort ausgelöst werden kann. Die Verbindung zwischen Signal und Zellantwort wird häufig durch ein regulatorisches Zwei-Komponenten-System hergestellt. Im typischen Fall besteht ein Zwei-Komponentensystem aus einer Sensor-Kinase und einem Response-Regulator (Chang & Stewart, 1998; Mizuno *et al.*, 1996). Die Sensor-Kinase nimmt über ihre Sensor-Domäne Signale der Umwelt wahr und phosphoryliert sich an einem spezifischen Histidin-Rest selbst (Autophosphorylierung) (siehe Abb. 3). Diese Phosphorylgruppe wird daraufhin auf den Aspartat-Rest des spezifischen Response Regulators übertragen, welcher dadurch aktiviert wird. Dieser bewirkt Anpassungen auf Abläufe in der Zelle oder auf der Ebene der Gen-Expression. Einen Sonderfall stellen hier die Hybrid-Histidin-Kinasen dar. Diese Proteine der Signaltransduktion tragen neben der Kinase-Domäne auch eine Response-Regulator-Domäne (Mizuno *et al.*, 1996). Neben den normalen Zwei-Komponenten-Systemen und den Hybrid-Histidin-Kinasen gibt es einige Zwei-Komponenten-Systeme, die mehr als eine Histidin-Kinase oder mehr als einen Response-Regulator nutzen.

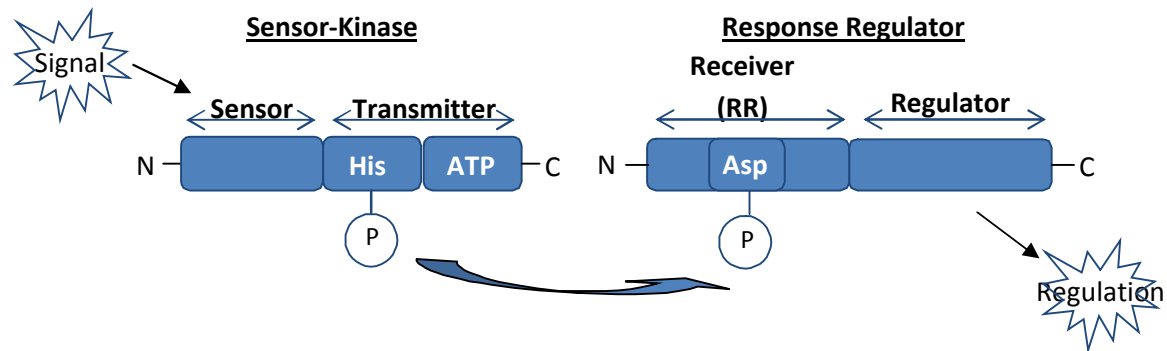


Abbildung 3 Darstellung eines Zwei-Komponenten-Systems. Gezeigt wird die Signaltransduktion über die Sensor-Kinase (Autophosphorylierung an einem Histidin (His)-Rest und den Response-Regulator (Phosphorylierung an einem Aspartat-Rest). (verändert nach Hwang *et al.*, 2002)

1.4.1.1. Response Regulatoren

In dem Cyanobakterium *S. elongatus* konnten bisher 40 potentielle Gene von Zwei-Komponenten-Systemen entdeckt werden (Ashby & Houmard, 2006). Davon gehören 21 zu den Response Regulatoren, die in vier Klassen unterteilt werden können (siehe Abb. 4).

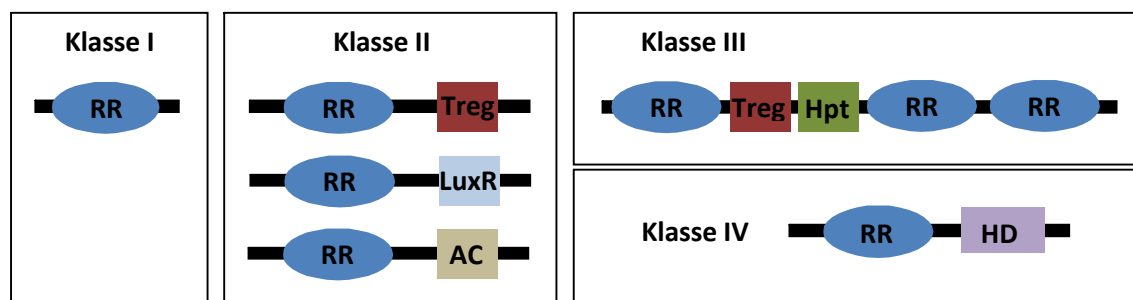


Abbildung 4 Beispiele für cyanobakterielle Response Regulatoren des Zwei-Komponenten-Systems. (RR) Response Regulator Receiver Domain, (Treg, LuxR, AC(AraC)) Effektor-Domänen, (Hpt) Histidine-Phosphotransfer, (HD) Phosphohydrolase Aktivität; (verändert nach Ashby & Houmard, 2006).

Klasse I-CheY Gruppe

Zur Klasse I-CheY Gruppe gehören sehr kleine Polypeptide mit weniger als 200 Aminosäuren (aa), ohne Regulator-Domäne. In *E. coli* transferiert die Histidin-Kinase CheA die Phosphorylgruppe auf CheY, der wiederum direkt mit dem Flagellenmotor-Protein interagiert (Bilwes *et al.*, 1999). PilH aus *Synechocystis* gehört ebenfalls zur Klasse I und wird zur Beweglichkeit der Zellen benötigt (Yoshihara *et al.*, 2002). In *S. elongatus* und *Synechocystis* ist DivK an der Zellteilung beteiligt.

Klasse II

Zur Klasse II gehören die „typischen“ Zwei-Komponenten DNA-bindenden Response Regulatoren. Sie besitzen eine N-terminale Receiver-Domäne (Rec), die mit einer DNA-bindenden Regulator-Domäne fusioniert ist. Die Receiver-Domäne enthält den konservierten Aspartat-Rest, an dem der Response Regulator phosphoryliert wird. Durch die Phosphorylierung wird die C-terminale Regulator-Domäne aktiviert. Die Klasse II wird nach dieser Domäne in weitere Unterklassen (OmpR, NarL, AraC) unterteilt.

OmpR-Typ Response Regulator

(transcriptional regulatory (T_{reg}) effector-domain)

Aufgrund von Sequenzhomologien gehört das *S. elongatus* NblR Protein zu den OmpR-Typ Response Regulatoren (Schwarz & Grossman, 1998). Die dazugehörige Kinase ist bisher noch unbekannt. Ebenfalls zur OmpR-Typ Unterklasse gehört *Synechocystis* RpaB (Ycf22), der an die *high light regulatory 1* (HLR1) DNA-Sequenz bindet und für die Langzeit-Regulation des Energietransfers von Photosystem I und II durch die Phycobilisomen verantwortlich ist (Ashby & Mullineaux, 1999; Kappell & van Waasbergen, 2007). SphR/PhoB ist der Partner der Histidin-Kinase SphS. Dieses Zwei-Komponenten-System reguliert das *pho* Regulon in der Signalkaskade des Phosphat-Mangels.

Klasse III und IV

Zur Klasse III zählen Response Regulatoren mit zwei oder drei Response Regulator Domänen zusammen mit T_{reg} (*C-terminal part of transcriptional regulatory protein*) und Phosphotransfer Domäne. Die meisten Proteine der Gruppe IV besitzen keine DNA-bindende Domäne, jedoch Regulator-Domänen mit katalytischer Aktivität.

1.4.2. Regulation des Stickstoff-Metabolismus in Cyanobakterien

Die Stickstoffassimilation in Cyanobakterien unterliegt einer strikten Regulation abhängig von der Verfügbarkeit einer Stickstoff- und Kohlenstoff-Quelle (C_i: CO₂ und HCO₃⁻). Die Anwesenheit von Ammonium führt zu einer Unterdrückung der Aufnahme von anderen Stickstoffquellen, der so genannten Ammoniumrepression (Flores & Herrero, 1994). Zusätzlich wirkt sich auch das Gleichgewicht zwischen dem zur

Verfügung stehenden Kohlenstoff- und der Stickstoffquelle auf die Stickstoff-Regulation aus: ein Mangel an Kohlenstoff (C_i) führt zu einer Unterdrückung der N-Assimilation.

Die zentralen Elemente der Stickstoff-Regulation und der C/N Balance (globale Stickstoffkontrolle) sind das PII Signaltransduktionsprotein und der Transkriptionsfaktor NtcA.

1.4.2.1. Das Signaltransduktionsprotein PII

Das Signaltransduktionsprotein PII gehört zu den am weitesten verbreiteten Signalproteinen in der Natur. PII-homologe Proteine wurden sowohl in Bakterien als auch in Eukaryoten (Chloroplasten von Algen und Pflanzen) und Archaeen identifiziert (Arcondeguy *et al.*, 2001; Ninfa & Atkinson, 2000). Die Proteine der PII Familie können in drei Untergruppen eingeteilt werden, die Produkte der Gene: *glnB*, *glnK* und *nifl* (Arcondeguy *et al.*, 2001). PII ist ein homotrimeres Protein mit je 12-13 kDa je Untereinheit, welche aus alternierenden α - und β - Sekundärstrukturen aufgebaut sind (Xu *et al.*, 2003). Jedes Monomer enthält drei Schleifen, die T-, B-, und C-Loop genannt werden.

In Abhängigkeit der Stickstoffverfügbarkeit können PII Proteine auch kovalent am T-Loop modifiziert werden (Xu *et al.*, 1998). Das PII Protein von Enterobakterien wird in Abhängigkeit des intrazellulären Stickstoff-Status (Glutamin) durch Uridylylierung am Tyrosin 51 kovalent modifiziert (Jaggi *et al.*, 1996). In Aktinobakterien wird dieser Tyrosinrest adenyliert (Burkovski, 2007; Hesketh *et al.*, 2002). In *Bacillus subtilis* (Firmibakterien) und einigen weiteren Organismen scheint das PII Protein nicht modifiziert zu werden (Heinrich *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu kann das PII Protein in Cyanobakterien am Serin 49 phosphoryliert werden (Forchhammer & Tandeau de Marsac, 1995).

PII Proteine sind an der Signaltransduktion in verschiedenen Stoffwechselwegen beteiligt und stehen unter Kontrolle unterschiedlicher intrazellulären Stimuli, welche über Effektormoleküle die Aktivität der PII-Proteine kontrollieren und Konformationsänderungen hervorrufen. Die PII-regulierten Enzyme aktivieren bzw. inhibieren dann die Transkription oder die Aktivität der metabolischen Enzyme.

Die Signalwahrnehmung über PII findet in Cyanobakterien durch die Bindung der Effektormoleküle ATP und α -Ketoglutarat statt (Forchhammer & Hedler, 1997; Ninfa & Jiang, 2005). Die Bindung der verschiedenen Liganden beeinflusst die Konformation des T-Loops des PII Proteins (Forchhammer, 2008). Unter Stickstoffmangelbedingungen (hoher intrazellulärer α -Ketoglutarat Spiegel) wird das PII Protein der Cyanobakterien an dem Serin 49 phosphoryliert (Forchhammer & Tandeau de Marsac, 1994). Bei niedriger α -Ketoglutarat Konzentration wird das phosphorylierte PII Protein durch eine Protein Phosphatase der PPM Familie (PphA) dephosphoryliert (Forchhammer, 2004; Irmiler *et al.*, 1997; Kloft *et al.*, 2005).

Physiologische Untersuchungen zeigten eine Regulation durch das PII Proteine bei der Nitrat-Aufnahme (Kloft & Forchhammer, 2005; Lee *et al.*, 2000) und der Nitrat-Reduktase-Aktivität (Takatani *et al.*, 2006). Direkte Protein-Protein Interaktion mit PII konnte in *Synechocystis* mit dem transmembranen Protein PamA nachgewiesen werden (Osanai *et al.*, 2005). In *S. elongatus* konnte die N-Acetyl-L-Glutamat Kinase (NAGK), das Schlüsselenzym der Argininbiosynthese, als Ziel-Protein von PII nachgewiesen werden (Burillo *et al.*, 2004; Heinrich *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PipX (PII interacting partner X) in Abhängigkeit der α -Ketoglutarat Konzentration PII oder NtcA binden kann (Espinosa *et al.*, 2006a).

1.4.2.2. Transkriptionskontrolle durch NtcA

Der Transkriptionsfaktor NtcA gehört zu der Crp/FNR Familie der Transkriptionsfaktoren, deren N-terminaler Bereich als Sensor agiert und im C-terminalen Bereich eine Helix-Turn-Helix (HTH) Domäne zur DNA-Bindung ausweist. (Vega-Palas *et al.*, 1990; Vega-Palas *et al.*, 1992). NtcA erkennt und bindet als Dimer an eine palindromische Sequenz (GTA N₈ TAC) bestimmter Gene und agiert als Aktivator oder Repressor (Luque *et al.*, 1994). Untersuchungen zeigten, dass die zwei jeweils äußeren Nucleotide der Tripletts (GTA und TAC) die wichtigsten Nucleotide zur NtcA-DNA Bindung sind (Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002a). Zusätzlich scheinen auch die Nukleotide *downstream* des GTA Tripletts, sowie eine AT-reiche flankierende Region sich auf die NtcA Bindung auszuwirken. Darüber hinaus konnte eine NtcA-DNA Bindung auch bei abweichendem

Abstand der Triplets (N₇ oder N₉) oder abweichender palindromischer Sequenz nachgewiesen werden (Jiang *et al.*, 2000).

NtcA ist der globale Stickstoffregulator in Cyanobakterien und kontrolliert die Transkription von Genen, die der Ammoniumrepression unterworfen sind (Herrero *et al.*, 2001). In einigen Cyanobakterien konnte gezeigt werden, dass *ntcA* einer Autoregulation unterliegt. Die Expression von *ntcA* steigt in Abwesenheit von Ammonium an (Lindell *et al.*, 1998; Luque *et al.*, 1994; Muro-Pastor *et al.*, 2002). Der molekulare Mechanismus der NtcA Aktivierung ist bislang noch ungeklärt. Jedoch wirkt sich der intrazelluläre α -Ketoglutarat Spiegel, das PII Protein und das PipX Protein auf die Aktivität aus (Aldehni *et al.*, 2003; Espinosa *et al.*, 2006a; Espinosa *et al.*, 2007; Paz-Yepes *et al.*, 2003; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002a).

PipX (*PII interaction partner X*) ist ein kleines Protein, welches in allen bisher sequenzierten Cyanobakterien vorkommt. Es wird vermutet, dass PipX als transkriptionaler Coaktivator von NtcA wirkt, da gezeigt werden konnte, dass PipX für die Aktivierung der NtcA-abhängigen Gene *glnB*, *glnN* und *nblA* im Stickstoffmangel benötigt wird (Espinosa *et al.*, 2006a; Espinosa *et al.*, 2007). *In vitro* ist PipX in der Lage, sowohl mit PII als auch mit NtcA zu interagieren. Die *in vitro* Komplexbildung von PipX mit PII oder NtcA ist abhängig von der α -Ketoglutarat Konzentration. Bei geringer α -Ketoglutarat Konzentration bindet PipX bevorzugt an PII. Die geringe α -Ketoglutarat Konzentration entspricht den Bedingungen bei Wachstum auf Ammonium. Bei hoher α -Ketoglutarat Konzentration bildet PipX einen stabilen Komplex mit NtcA. *In vivo* werden hohe α -Ketoglutarat Konzentrationen im Stickstoffmangel erreicht und die Transkription der NtcA-abhängigen Gene wird aktiviert. Bei mittlerer α -Ketoglutarat Konzentration kommt es zur Konkurrenz von PII und NtcA um PipX. Dies entspricht Nitrat-gewachsenen Zellen. Die Expression von NtcA-abhängigen Genen ist in Nitrat-gewachsenen Zellen im Vergleich zu Stickstoffmangel-Zellen deutlich schwächer. *In vitro* konnten Tanigawa *et al.* (2002) zeigen, dass die Transkription von NtcA-abhängigen Genen nur in Anwesenheit von α -Ketoglutarat aktiviert wird.

In Cyanobakterien aktiviert NtcA die Gene für die Aufnahme von Stickstoff. Dazu gehören zum Beispiel *amt1* (Montesinos *et al.*, 1998; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002b), *nrtABCD* (Frías *et al.*, 2000; Luque *et al.*, 1994) und in *S. elongatus* *amtB* (Paz-Yepes *et al.*, 2007). NtcA aktiviert des weiteren Gene für die intrazelluläre Bildung von

Ammonium wie *nirA*, *narB* und *cynS* (Frías *et al.*, 1997; Harano *et al.*, 1997) und Metabolisierung von Ammonium über den GS/GOGAT Zyklus (*glnA*, *glnN*) (Reyes & Florencio, 1994; Sauer *et al.*, 2000). Darüber hinaus wirkt NtcA auf weitere regulatorische Gene, so zum Beispiel *glnB* (García-Domínguez & Florencio, 1997), *ntcB* (Aichi *et al.*, 2001), *gifA* und *gifB* (García-Domínguez *et al.*, 2000). Auch die Expression von *nblA*, ein essentielles Gen in der Anpassung an Nährstoffmangel (siehe unten) wird durch NtcA aktiviert (Luque *et al.*, 2001; Richaud *et al.*, 2001).

1.5. Cyanobakterielle Anpassung an generellen und spezifischen Nährstoffmangel

Cyanobakterien besitzen zahlreiche Mechanismen um sich an einen Nährstoffmangel anzupassen (Schwarz & Forchhammer, 2005; Tandeau de Marsac & Houmard, 1993). Durch verschiedene Mangelsituationen werden generelle Stressreaktionen ausgelöst. Zusätzlich treten während des Mangels eines Nährstoffs spezifische Reaktionen auf. Generell führt ein Nährstoffmangel zur Verlangsamung anaboler Reaktionen und somit zur Verlangsamung der Re-Oxidation des Ferredoxins aus PS I (siehe oben). Dadurch kommt es zur Blockierung des photosynthetischen Elektronentransportes (Grossman *et al.*, 1993a; Schwarz & Grossman, 1998). In nicht-diazotrophen Cyanobakterien ist die Anpassung des Photosyntheseapparates an Nährstoffmangel als der Prozess der Chlorose bekannt (Allen & Smith, 1969). Die Chlorose zeichnet sich durch den Abbau der Lichtsammelantennen (Phycobilisomen, siehe oben) und dem Abbau von Chlorophyll a, dem Pigment der Reaktionszentren von PS I und PS II aus. Dadurch verändert sich die Färbung der Zellen von dem typischen blau-grün nach gelb. Der Verlauf des Pigmentabbaus variiert je nach Art des Nährstoffmangels und ist abhängig von Temperatur, CO₂-Verfügbarkeit und Lichtintensität (Barker-Astrom *et al.*, 2005; Collier & Grossman, 1992; Görl *et al.*, 1998). Ein Mangel an Phosphat, anorganischem Kohlenstoff oder Eisen führt nur zu einem partiellen Verlust der Phycobilisomen. In *S. elongatus* erfolgt bei Stickstoff- oder Schwefelmangel ein schneller und vollständiger Abbau der Phycobilisomen (Collier & Grossman, 1992; Yamanaka & Glazer, 1980). Innerhalb der ersten 12 h des Stickstoffentzugs werden zunächst die äußeren Phycocyanin-Hexamere

abgebaut. Der Abbau schreitet bis zum vollständigen Abbau des Kerns fort (siehe Abb. 5) (Grossman *et al.*, 1993a).

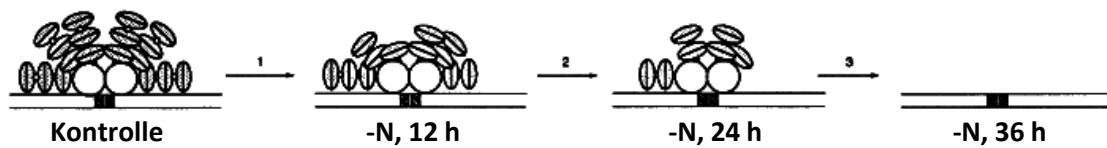


Abbildung 5 Verlauf des Phycobilisomenabbaus in *S. elongatus* Wildtyp während Stickstoff-Mangel (-N). Die Abbildung zeigt die Phycobilisomen verbunden mit der Thylakoidmembran und dem Photosynthese Reaktions-Zentrum. (Abbildung verändert nach Grossman *et al.*, 1993b)

Zur Untersuchung des molekularen Mechanismus des Degradierungsprozesses wurden *S. elongatus*-Mutanten isoliert, die die Fähigkeit zum Abbau der Lichtsammelkomplexe verloren hatten. Das erste identifizierte Gen in *S. elongatus* war *nblA*, das für ein kleines Polypeptid NblA (non-bleaching protein A) mit 59 Aminosäuren kodiert. Die höchste Expression dieses Gens wurde während Stickstoff- oder Schwefelmangels sowie Starklicht-Stress beobachtet. Bisher konnte in allen Organismen, die Phycobilisomen enthalten, (Cyanobakterien und Rotalgen) wenigstens ein *nblA*-Gen nachgewiesen werden. NblA besitzt keine enzymatische Aktivität, bindet aber mit dem C-terminalen Teil spezifisch an die α -Untereinheit von Phycocyanin und Phycoerythrocyanin (Bienert *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass NblA mit ClpC, dem HSP100 Chaperon der Clp Protease interagieren kann. Beide Proteine (Phycobilisom, ClpC) können gleichzeitig von NblA gebunden werden. Daher wird vermutet, dass NblA als Adapterprotein zwischen dem ClpC-ClpP Komplex und den Phycobiliproteinen fungiert und dadurch den Abbau der PBS einleitet (Karradt *et al.*, 2008).

Ein weiteres für den Phycobilisomen Abbau wichtiges Gen ist *nblB*. Es zeigt Homologien zu der Chromophor-interagierenden Phycocyanin Lyase, die die Chromophore an die Phycobilisomen anlagert. Möglicherweise bewirkt NblB die umgekehrte Reaktion und ist somit beim Abbau der Phycobilisomen beteiligt (Dolganov & Grossman, 1999).

In *S. elongatus* wurden weitere regulatorische Proteine im Chlorose Prozess identifiziert. Dazu gehören NblR, mit Homologien zu Response Regulatoren der OmpR Familie (Schwarz & Grossman, 1998), eine Sensor Histidin Kinase NblS (van Waasbergen *et al.*, 2002), sowie NblC mit Homologien zu eubakteriellen Anti-Sigmafaktoren (Sendersky *et al.*, 2005). Neben der Aktivierung von *nblA* durch NblR, NtcA, PipX und NblC scheint auch

eine negative Regulation durch einen NblS abhängigen Response Regulator, der an das HLR1 (*high light regulatory*) Motiv bindet, möglich (Kappell *et al.*, 2006; Salinas *et al.*, 2007). In *Synechocystis* konnte gezeigt werden, dass der Response Regulator RpaB an das HLR1 Element des hliB (*high-light inducible*) Promotors bindet. Möglicherweise ist RpaB der Response Regulator von NblS (Kappell & van Waasbergen, 2007).

SipA (NblS *interacting protein A*) in *S. elongatus* interagiert mit der ATP-Bindedomäne von NblS und ist für die Repression von *nblA* notwendig (Espinosa *et al.*, 2006b; Salinas *et al.*, 2007). Interessanterweise scheint die Interaktion von NblS-SipA der Funktion des Response Regulators NblR entgegenzuwirken (Salinas *et al.*, 2007). So führte eine Überproduktion von SipA oder ein Mangel an NblR (in der NblR Mutante) zu einer verminderten Überlebensfähigkeit bei Nährstoffmangel oder Starklicht-Stress. Während die Inaktivierung von SipA im NblR-defizienten Hintergrund zwar den *nonbleaching* Phänotyp nicht aufhob, wurde die Überlebensfähigkeit jedoch deutlich erhöht.

Aufgrund von Sequenzhomologien gehört NblR zur OmpR-Typ Klasse II der Response Regulatoren (siehe oben). Eine Phosphorylierung von NblR konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Kato *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2008).

Die NblR-Mutante wies einen *nonbleaching* Phänotyp sowie eine verringerte Überlebensfähigkeit bei Nährstoffmangel (Stickstoff-, Schwefel-, Phosphat-Mangel) und Starklicht-Exposition auf. Darüber hinaus war die Expression des *nblA* Genes, das für die Initiation des Phycobilisomen-Abbaus verantwortlich ist, stark verringert (Luque *et al.*, 2001; Schwarz & Grossman, 1998).

1.6. Zielsetzung dieser Arbeit

In dem nicht-diazotrophen Cyanobakterium *S. elongatus* führt ein Mangel an gebundenem Stickstoff oder Schwefel zu einem Differenzierungsprozess der Chlorose (siehe oben). In diesem streng regulierten Prozess wirken die Reaktionen der generellen Stressantwort, das nbl-System, sowie die Nährstoff spezifischen Reaktionen, des NtcA Regulons.

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass das Fehlen von NblR in *S. elongatus* zu einem *nonbleaching*-Phänotyp und zum Absterben der Zellen bei Stickstoff-, Schwefel- und Phosphatmangel führte. Als einziges Ziel-Protein des putativen Response Regulators NblR war *nblA* bekannt. Die *nblA* Expression in der NblR-Mutante war unter Mangelbedingungen deutlich reduziert im Vergleich zu den *S. elongatus* Wildtyp-Zellen. Die reduzierte NblA-Menge aufgrund geringerer *nblA*-Expression in der NblR-Mutante kann jedoch nicht allein zum Absterben der Zellen führen, da die NblA-Mutante in der Lage ist, Stickstoff- und Schwefelmangel zu überleben.

Durch Studien an der NblR-Mutante sollte versucht werden eine mögliche Rolle von NblR im Chloroseverlauf, insbesondere im Überlebensprozess zu definieren und dadurch einen tieferen Einblick in die Regulation der Stressantwort der Zellen zu erhalten. Hierfür wurde die Auswirkung der Deletion von NblR auf verschiedenen Ebenen näher durchleuchtet. Durch physiologische Methoden wurden die speziellen Reaktionen der NblR-Mutante während Stickstoff- und Schwefelmangel untersucht. Biochemische Methoden sollten mögliche Funktionen des NblR-Proteins aufdecken. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf mögliche noch unbekannte Interaktionspartner von NblR gelegt.

Eine globale Analyse der Genexpression nach Stickstoffentzug sollte darüber hinaus einen Überblick und neue Erkenntnisse im Differenzierungsprozess der Chlorose ermöglichen. Dabei diene der Vergleich des Transkriptoms einer *S. elongatus* NblR-Mutante mit dem Transkriptom des Wildtyps sowie mit der Mutante des Transkriptionsfaktors NtcA (NtcA-Mutante) und des Coaktivators von NtcA, PipX (PipX-Mutante) als Grundlage, um gemeinsame und unterschiedliche Regulationswege der globalen und spezifischen Genregulationen während Stickstoffmangels aufzuzeigen.

Der Vergleich der Expression von bereits bekannten Zielgenen der Regulatoren des Stickstoffmetabolismus NtcA und NblR könnten in den jeweiligen Mutanten noch unbekannte Zielproteine von NtcA und NblR liefern. Dabei lag das Augenmerk auch auf möglichen weiteren NtcA-abhängigen Genen.

Durch Untersuchung der Bindungseigenschaften von NtcA an verschiedene DNA-Fragmente mit Hilfe der *surface-plasmon-resonance* (SPR) Analyse sollten weitere Erkenntnisse über die Erkennungsspezifität von NtcA ermöglichen, insbesondere im Hinblick auf bisher noch unbekannte NtcA-abhängige Promotoren, die durch die Transkriptom-Analyse entdeckt wurden.

Aufgrund der Vielschichtigkeit der Untersuchung wurde die Arbeit in drei Teilabschnitte unterteilt. Der Abschnitt A dieser Arbeit beinhaltet die Charakterisierung der DNA-Bindungseigenschaften von NtcA. Im Abschnitt B wurde die globale Analyse der Genexpression nach Stickstoffentzug des Wildyps und der NblR-, NtcA- und PipX-Mutante eingehend betrachtet. Im Anschluss daran wurden im Abschnitt C die Ergebnisse der physiologischen und biochemischen Charakterisierung der NblR-Mutante ausführlicher diskutiert.

Abschnitt A

Charakterisierung der DNA-Bindungseigenschaften von NtcA

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme und Kultivierungsbedingungen

Die verwendeten *Escherichia coli* (*E. coli*) -Zellen aus Tabelle 1 wurden in Luria-Bertani (LB) Medium nach Sambrock *et. al.* (1989) kultiviert. Zur Selektion wurde Ampicillin (Amp) 100 µg/ml zugefügt. Die Zellen wurden auf einem Rundschüttler bei 37 °C angezogen.

Tabelle 1 verwendete *E.coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi1, hsdR17, relA1, supE44, lac</i>	Bullock <i>et. al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>F-, ompT, hsdSB, λDE3</i>	Großberg und Dunn, 1988
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44, ΔlacU169, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1,</i>	Hanahan, 1983

2.2. Herstellung der Plasmide

Die Klonierung des Zielgens (*ntcA*) aus *S. elongatus* in den Expressionsvektor pET15b (Novagen) (pET15b-NtcA) erfolgte wie in Aldehni (2005) beschrieben. Der Vektor pET15b führt zu einer Fusion eines 6x His-Epitops mit dem N-terminalen Ende des Zielproteins. Der Expressionsvektor pUAGC470 besteht aus dem pASK-IBA3 (IBA GmbH, Göttingen) und der *pipX* Sequenz aus *S. elongatus*. Dieser Vektor führt zu einer Fusion der Strep-tag II Sequenz an das C-terminale Ende des Zielproteins (PipX). Die Klonierung und Aufreinigung erfolgte wie in Espinosa *et al.* (2006a) beschrieben.

2.3. Überexpression von NtcA in *E. coli* BL21-Zellen

Rekombinantes NtcA Protein aus *S. elongatus* wurde aus IPTG induzierten *E. coli*-BL21 (pET15b-NtcA) Zellextrakten gewonnen. Das zu exprimierende Gen (*ntcA*) steht unter der Kontrolle eines T7/*lac* Promotors. Von dem transformierten und selektionierten *E. coli*- BL21 (DE3) Stamm mit dem entsprechenden Expressionsplasmid wurde eine 6 ml Vorkultur von der LB-Amp-Platte angeimpft. Für die Hauptkultur wurden 500 ml LB-Amp-Flüssigmedien mit den Vorkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bei

37 °C schüttelnd inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,8 wurden die Zellen mit IPTG (1mM Endkonzentration) induziert und bei Raumtemperatur weiter inkubiert. Vier Stunden nach Induktion wurden die Zellen geerntet und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

2.4. Aufreinigung von rekombinantem NtcA aus *E. coli* Extrakten

Ab dem Zeitpunkt der Ernte wurden alle Schritte bei 4 °C durchgeführt, um eine Degradation der Proteine zu verhindern. Die geernteten Zellen wurden in 10 ml Zellaufbruchpuffer resuspendiert und mit Hilfe von Ultraschallpulsen für 2 x 2 min aufgebrochen. Nach Entfernung der Zelltrümmer und unlöslicher Bestandteile durch zwei Zentrifugationsschritte (18.000 x g, 4 °C, 10 min und 30 min) wurde das Zelllysats auf eine His-SelectTM-Säule (Ni-NTA, Sigma) geladen. Die Aufreinigung wurde an einer *BioRad Biologic Workstation* überwacht. Durch den angeschlossenen UV-Detektor konnte das Wasch- und Elutionsprofil aufgezeichnet werden. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min in Waschpuffer wurden alle unspezifisch gebundenen Proteine von der Säule gespült (ca. 10 Säulenvolumen). Anschließend wurde das gebundene NtcA-His-Protein mit Elutionspuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min eluiert. Die Effizienz der Aufreinigung wurde von ausgewählten Wasch- und Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE überprüft. Die Elutionsfraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration wurde mit Hilfe *RotiQuant*[®]-Bradford-Reagenz (Roth) bestimmt und die entsprechenden Fraktionen wurden über Nacht gegen Lagerpuffer dialysiert. Die Endkonzentration wurde spektrometrisch aus der Absorption bei 280 nm und dem Extinktionskoeffizienten der Aminosäure-Zusammensetzung von 4470 M⁻¹ cm⁻¹ (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) bestimmt. Das Protein wurde anschließend bei -20 °C aufbewahrt.

Zellaufbruchpuffer (pH 7,4)

20	mM	Tris-HCl, pH 7,4
50	mM	KCl
600	mM	NaCl
0,5	mM	EDTA
1	mM	Benzamidin
0,2	mM	PMSF

Waschpuffer (pH 8,0)

50	mM	Na-Phosphatpuffer
300	mM	NaCl
20	mM	Imidazol

Elutionspuffer (pH 8,0)

50	mM	NaPO ₄ , pH 8,0
300	mM	NaCl
250	mM	Imidazol

Dialysepuffer (pH 7,4)

20	mM	Tris-HCl, pH 7,4
50	mM	KCl
0,5	mM	EDTA
50	%	Glyzerin

2.5. Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR (*site directed mutagenesis*)

Der *glnA*-Promotorbereich weist eine kanonische NtcA Bindestelle auf (GTA N₈ TAC). Um die Spezifität dieses Palindroms näher zu untersuchen, wurden die Bindestellen mit Hilfe von Oligonukleotiden (siehe Tab. 2) und PCR mutiert. Der *glnA*-Promotorbereich wurde mit Hilfe der Oligonukleotide aus Tabelle 2 in zwei Teilstücken amplifiziert (A) und (B), wobei die NtcA Bindestelle und somit die jeweilige Mutationsstelle an den 5'- bzw. 3'-Enden lokalisiert waren (siehe Klonierungsschema Abb. 6). Für die Herstellung der Mutante 1 (M1) als auch in der Mutante 2 (M2) wurde jeweils nur eine Seite des Palindroms mutiert, während in der Mutante 3 (M3) beide Hälften des Palindroms mutiert wurden. In einer ersten PCR erfolgte der Austausch in M1 von GTA nach ATG, in M2 der Austausch von TAC nach CAT und in M3 wurde GTA nach ATG sowie TAC nach CAT mutiert (siehe unten). Durch den Austausch M1 wird eine Sequenzfolge von ATG N₈ TAC erreicht. Die Mutation M2 führt zu einer identischen Sequenzfolge wie M1 (ATG N₈ TAC) allerdings auf dem entgegengesetzten „*reversen*“ DNA-Strang (siehe Abb. 7). Der Austausch M3 stellt eine palindromische Sequenz her (ATG N₈ CAT). In einer zweiten PCR wurden die zwei Teilstücke (A) und (B) aus der ersten PCR als Template eingesetzt, fusioniert und mit den jeweiligen äußeren Primern vervielfältigt (siehe Abb. 6). Dieses Produkt wurde in pJET Vektor (Fermentas) eingebracht.

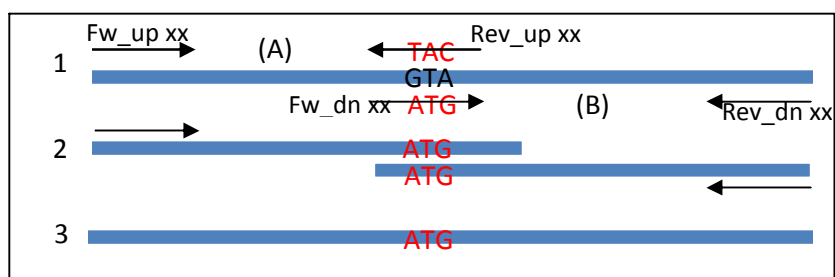


Abbildung 6 Klonierungsschema der zielgerichteten Mutagenese durch PCR. Beispiel der Mutagenese von Mutante 1. (1) Erste PCR führt zu dem Basenaustausch GTA nach ATG (in rot) mit den jeweiligen Fw (*forward*) und Rev (*reverse*) Primern zu zwei PCR Produkten (A) und (B). (2) Teilstücke (A) und (B) werden in einer zweiten PCR fusioniert und vervielfältigt mit Hilfe der äußeren Primer (Fw_{up} und Rev_{dn}). (3) Endprodukt der zweiten PCR

glnA – Promotor:

Wildtyp (Wt):	Mutante 1 (M1):	Mutante 2 (M2):	Mutante 3 (M3):
GTA ... TAC	ATG ... TAC	GTA ... CAT	ATG ... CAT
CAT ... ATG	TAC ... ATG	CAT ... GTA	TAC ... GTA

Abbildung 7 Vergleich der Sequenz der NtcA Bindestelle des *glnA*-Promotors der Wildtyp (Wt)-DNA und nach der Mutagenese. Mutanten 1-3 (M1, M2, M3)

Ein Fusions-PCR Ansatz bestand aus:

Fusions-PCR-Ansatz:	Endkonzentrationen:
(A) Upstream- Fragment	30 ng
(B) Downstream-Fragment	30 ng
Fw_up_XX Primer	20 pmol
Rev_dn_XX Primer	20 pmol
dNTPs	0,2 mM jeweils
10X PCR Puffer mit MgSO ₄	1 X
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	1,2 U

Die Fusions-PCR wurde nach folgendem variierten Programm nach Sambrock *et al.* (1989) durchgeführt:

1.	Initiale Denaturierung:	2 min	94 °C
2.	8 x 3-Schritt-Zyklus: (Fusion)		
	Denaturierung	30 sec	94 °C
	Hybridisierung	1 min	50 °C
	Synthese	1 min	72 °C
3.	30 x 3-Schritt Zyklus:		
	Denaturierung	30 sec	94 °C
	Hybridisierung	30 sec	57-59 °C
	Synthese	30 sec	72 °C
4.	Endsynthese	7 min	72 °C

Tabelle 2. In dieser Arbeit verwendete Primer für die Mutation der NtcA-Bindestelle im *glnA*-Promotorbereich. Die jeweilige Mutationsstelle ist markiert.

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5'... 3'
Fw_up glnA M1	5'-GGA ATT TCA GAA AAA GAC TAC CAT G-3'
Rev_up glnA M1	5'-AGC TGA CAT ATA AAA ATG GAG GCG ATT-3'
Fw_dn glnA M1	5'-AAT CGC CTC CAT TTT TAT ATG TCA GCT-3'
Rev_dn glnA M1	5'-GAT TGG TAG TCC ACA AGC CTA AC-3'
Rev_up glnA M2	5'-GGC ACT TTT ATG ACA GCT GAT ACA TAA-3'
Fw_dn glnA M2	5'-TTA TGT ATC AGC TGT CAT AAA AGT GCC-3'
Rev_dn glnA M2	5'-TCT TGA ATA AGC TGA AGG ACC TCT-3'

A - Material und Methoden

Fortsetzung Tab. 2

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5' ... 3'
Fw_up glnA M3	5'-AGG GAA TTT CAG AAA AAG ACT ACC AT-3'
Rev_up glnA M3	5'-CAC TTT TAT GAC AGC TGA CAT ATA AAA ATG G-3'
Fw_dn glnA M3	5'-CCA TTT TTA TAT GTC AGC TGT CAT AAA AGT G-3'
Rev_dn2 glnA M3	5'-GAG CGG TCT CAG GCA TGA GCG-3'

2.6. Protein-DNA Interaktionsstudien

Zur Untersuchung der Affinität und Spezifität von NtcA an verschiedenen Promotorregionen wurden die folgenden Interaktions-Experimente durchgeführt.

2.6.1. Retardierungsanalyse

2.6.1.1. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Das 159 bp *glnA*-DNA Fragment wurde durch PCR aus genomischer *S. elongatus* DNA und den Primerpaaren For_glnA7942-5 und Rev_glnA7942-6 (siehe Tab. 3) amplifiziert. Das *glnA*-Fragment enthielt zentral die palindromische NtcA-Bindestelle. Mit Hilfe des *QIAquick PCR Purifications Kits* (Qiagen) wurde das Fragment anschließend gereinigt und die Größe und Reinheit auf einem Agarosegel kontrolliert.

Die radioaktive Markierung der DNA erfolgte mit dem 5'End Labeling Kit (GE-Healthcare) mit 20 µCi [γ -³²P]ATP nach Herstellerangaben. Nach der Inkubation für 30 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 µl STE-Puffer beendet.

Reaktionsansatz:

200 ng	DNA
20 µCi	[γ - ³² P] ATP
1 U	T4 Polynukleotid Kinase (PNK)
1 X	PNK-Puffer

STE-Puffer (pH 7,5)

100 mM	NaCl
20 mM	Tris-HCl
10 mM	EDTA

Das 159 bp *glnA*-Fragment wurde anschließend über *ProbQuantTM G-50 Micro Columns* (Amersham) aufgereinigt um nicht eingebaute Nucleotide zu entfernen.

2.6.1.2. Gel-Retardierungsansatz

Die radioaktiv markierten DNA-Fragmente (1,5 ng, ca. 5500 cpm) wurden mit dem gereinigten NtcA Protein (10 ng) in einem 20 µl Ansatz im Reaktionspuffer nach Luque *et al.* (2002) für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend in einer nativen 4%-igen PAGE aufgetrennt. Nach Trocknung des radioaktiven Gels (2 h, 70 °C) wurde das Gel über Nacht auf einem PhosphorImager-Screen für β -Strahler exponiert. Visualisierung und Auswertung erfolgte an einem PhosphorImager (Molecular Imager Fx, BioRad).

Reaktionspuffer:

modifiziert nach Luque *et al.* (2001)

12	mM	HEPES, pH 8,0
4	mM	Tris-HCl, pH 8,0
60	mM	KCl
1	mM	DTT
50	µg	BSA
0,4	µg	Lachssperma-DNA
8	%	Glycerin

2.6.2. Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse (Biacore)

Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen DNA und Protein (NtcA) wurde eine Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse verwendet. Die Versuche wurden an einem BIAcore X und BIAcore 2000 System (Biacore AB, Uppsala) durchgeführt.

Oberflächen-Plasmon-Resonanz (*surface-plasmon-resonance*, SPR) tritt auf, wenn Licht von einem dünnen Goldfilm reflektiert wird. Dieser befindet sich auf einem Sensorchip, der in das Gerät eingeführt werden kann. Der hier verwendete SA-Sensorchip ist in der Lage biotinylierte Moleküle über Streptavidin-Biotin zu binden.

Im *SPR detection system* wird Licht einer nah-infrarot LED durch ein Prisma in einem bestimmten Winkel auf die Sensorchip Oberfläche fokussiert. Der Winkel und die Intensität des reflektierten Lichtes werden durch Licht-sensitive Dioden aufgezeichnet. Bindet ein Molekül (hier Protein) an die Chip-Oberfläche, ändert sich somit der Reflektionswinkel des Lichtes, der als Resonanz Units (RU) gemessen wird. Er stellt somit ein direktes Maß für die Menge an gebundenen Molekülen dar (siehe Abb. 8).

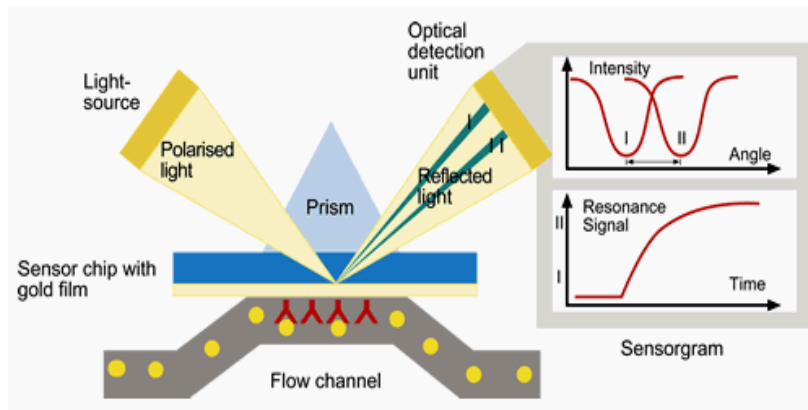


Abbildung 8 Schematische Darstellung des SPR Detection system der Biacore (Biacore, 2003).

2.6.2.1. Herstellung biotinylierter DNA

Für die SPR-Analyse wurden folgende biotinylierte DNA Fragmente, die zentral eine NtcA-Bindestelle trugen, an einen SA-Sensorchip gebunden: ein 159 bp *glnA*-, ein 206 bp *nblA*-, ein 214 bp *glnB*- und ein 202 bp *glnN*-Promotorfragment. Als Kontrollen dienten ein 159 bp DNA-Fragment aus der Kanamycin-Resistenzkassette des Plasmides pVZ322, sowie Fragmente mit mutierten NtcA-Bindestellen des 159 bp *glnA*-Promotorfragments (siehe oben). Die DNA wurde durch PCR mit Hilfe der Oligonukleotide der Tabelle 3 aus chromosomaler DNA aus *S. elongatus* oder Plasmid DNA gewonnen. Je ein Oligonukleotid war dabei am 5' Ende biotinyliert (siehe Tab. 3) (MWG Biotech, Ebersberg). Die Fragmente wurden durch Gelextraktion mit dem *QIAgen Gelextraction Kit* (Qiagen) gereinigt, um alle biotinylierten Primer zu entfernen.

Tabelle 3 verwendete Primer für die Herstellung biotinylierter Oligonukleotide, sowie der DNA-Fragmente für die Gel-Retardierungsanalysen

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5' ... 3'	Modifikation
For_Kana_biot	5'-GCT TTG TTG AAT AAA TCG AAC TTT TGC T-3'	5' Biotin
Rev_Kana	5'-AGC CAG AAA GTG AGG GAG CCA CG-3'	
For_glnA7942-5	5'-CGC CTG CAA GAT TTC GTT AC-3'	
Rev_glnA7942-6	5'-CAC AAC CAG GAA CTG AAG AC-3'	
Rev_glnA7942-6_biot	5'-CAC AAC CAG GAA CTG AAG AC-3'	5' Biotin
5'nblA-Prom	5'-GGC GCT GCC TGG GAA AGT C-3'	
3'rev-nblapr-biot	5'-GGG AGC CTC CGG CAC TGC-3'	5' Biotin
glnB.biac-Pr1	5'-CCT GAT CTT TCA GCA GTG GCT G-3'	5' Biotin
Rev-glnB-prom	5'-GCG CAA TCT TGA CTT CGT CAA G-3'	
For_glnN_biot	5'-AGG GTT CAA AGG ATT CTT GGT G-3'	5' Biotin
Rev_glnN_Prom	5'-GCT CCC GAT TGG TGA TCT GG-3'	

2.6.2.2. Vorbereiten und Beladen eines neuen Chips

Die Vorbereitung des SA-Sensorchips erfolgte nach Herstellerangaben in einem modifizierten Laufpuffer. Für die beste Leistung des Chips wurde vor dem Beladen dreimal für 1 min Regenerationspuffer injiziert. Die Immobilisierung der biotinylierten Fragmente (siehe oben) erfolgte bei einer sehr langsamen Flussrate von 2 µl/min um lange Kontaktzeiten mit der Streptavidin Oberfläche zu gewährleisten. Die biotinylierte DNA wurde in Laufpuffer mit 0,5 M NaCl injiziert bis etwa 1800 – 2000 RU erreicht waren.

Laufpuffer: filtriert und entgast

20	mM	HEPES, pH 7,5
50	mM	KCl
200	mM	NaCl
50	mM	Na-Acetat
1	mM	DTT
0,015	%	NP-40

Regenerationspuffer:

1	M	NaCl
50	mM	NaOH

2.6.2.3. Protein-DNA-Bindungsanalyse (Standardprozedur)

Alle Versuche wurden bei 25 °C in Laufpuffer (siehe oben) bei einer Flussrate von 15 µl/min durchgeführt. Um die Bindungseigenschaften von NtcA an verschiedene Promotoren zu testen, wurden unterschiedliche Konzentrationen an NtcA für jeweils 1 min injiziert. Der Analyt wurde in Laufpuffer vor der Injektion für 5 min mit oder ohne Effektormoleküle auf Eis inkubiert.

Die Regeneration der Oberfläche wurde durch Injektion von 5 µl Regenerationspuffer erreicht.

3. Ergebnisse

3.1. Abhängigkeit der DNA-Bindungseigenschaften von NtcA von Pufferbedingungen

Durch Gel-Retardierungs-Experimente konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor NtcA an den *glnA*- und *nblA*-Promotor binden kann (diese Arbeit Abschnitt C, Herrero *et al.*, 2001; Luque *et al.*, 2001). Die Analyse von nicht-perfekten NtcA-Bindestellen mittels Gel-Retardierungs-Experimenten ist jedoch nicht immer erfolgreich. So ist bekannt, dass *glnN* NtcA-abhängig exprimiert wird, eine Bindung von NtcA an die nicht-perfekte NtcA-Bindestelle im Promotorbereich von *glnN* konnte bisher aber nicht gezeigt werden (Aldehni & Forchhammer, 2006; Reyes & Florencio, 1994).

Eine Analyse mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) ermöglicht es jedoch, den Verlauf der Interaktion eines Proteins mit DNA direkt zu beobachten, da eine Bindung des Proteins an die DNA-beladene Oberfläche des Sensorchips zu einer sofortigen Änderung der Resonance Units (RU), als Maß für die Menge an gebundenem Liganden führt.

Das DNA-Fragment des *glnA*-Promotors (F-*glnA*) wurde auf eine Fließzelle (FC 2) des SA-Sensorchips eines Biacore-Gerätes geladen. Eine weitere Fließzelle (FC 1) des SA-Sensorchips blieb unbeladen. Bei den ersten Experimenten wurde ein Laufpuffer (siehe Abschnitt A Material und Methoden) mit einer Salzkonzentration von 50 mM NaCl gewählt.

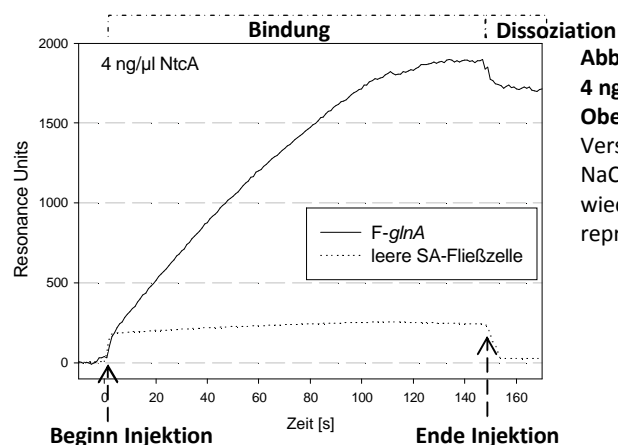


Abbildung 9 Bindung und Dissoziations-SPR von 4 ng/μl NtcA an F-*glnA* sowie an die unbeladene Oberfläche des SA-Sensorchips. In diesen Versuchsansätzen wurde ein Laufpuffer mit 50 mM NaCl verwendet. Das Experiment wurde mehrfach wiederholt und die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis.

Die Abbildung 9 zeigt ein Sensorgramm mit Bindungs- und Dissoziationsphasen nach Injektion von 4 ng/ μ l NtcA auf der F-*glnA* beladenen Fließzelle des SA-Sensorchips im Vergleich zur unbeladenen Fließzelle. An die mit F-*glnA* beladene Fließzelle kam es während der Injektion von NtcA zu einer deutlichen Zunahme der Resonance Units (siehe Abb. 9), was eine Bindung von NtcA an F-*glnA* anzeigt. An die unbeladene Chip-Oberfläche der Fließzelle FC 1 konnte keine Zunahme der Resonance Units im Verlauf der Injektion beobachtet werden (siehe Abb. 9). Eine unspezifische Bindung von NtcA an die leere Chip-Oberfläche konnte daher ausgeschlossen werden.

Die sprunghafte Zunahme der Resonance Units zu Beginn der Injektion und die sprunghafte Abnahme der Resonance Units am Ende der Injektion werden als sogenannter Puffersprung bezeichnet. Der Puffersprung wird nicht durch Bindung von Protein an die Oberfläche hervorgerufen, sondern durch geringe Unterschiede in der Zusammensetzung des Laufpuffers und Injektionspuffers.

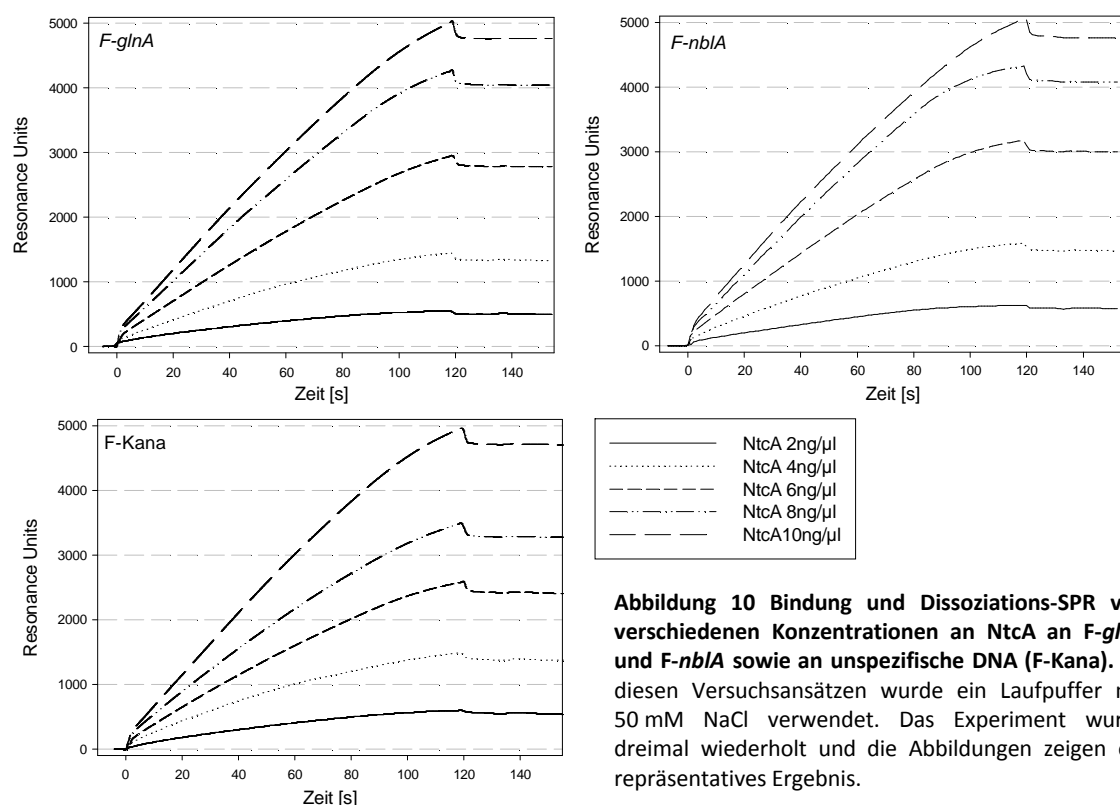


Abbildung 10 Bindung und Dissoziations-SPR von verschiedenen Konzentrationen an NtcA an F-*glnA* und F-*nblA* sowie an unspezifische DNA (F-Kana). In diesen Versuchsansätzen wurde ein Laufpuffer mit 50 mM NaCl verwendet. Das Experiment wurde dreimal wiederholt und die Abbildungen zeigen ein repräsentatives Ergebnis.

In weiteren Bindungsstudien wurde in Fließzelle FC 2 ein dem *nblA*-Promotor entsprechendes DNA-Fragment (F-*nblA*) und in Fließzelle FC 1 ein DNA Fragment ohne NtcA-Bindestelle (unspezifische DNA, F-Kana) (siehe Abschnitt A Material und

Methoden) mit jeweils 2000 RU geladen. Anschließend wurden Bindungsstudien mit unterschiedlichen Mengen NtcA an die DNA-Fragmente F-*nblA*, F-Kana und zum Vergleich an F-*glnA* durchgeführt (siehe Abb. 10).

Die Sensorgramme in Abbildung 10 zeigen die Bindungs- und Dissoziationsphasen von NtcA an die Sensorchip-gebundene DNA F-*glnA* und F-*nblA* sowie an die unspezifische DNA (F-Kana) mit unterschiedlichen NtcA-Konzentrationen. Mit steigender Konzentration an NtcA nahmen die Resonance Units und somit auch die Menge an gebundenem NtcA an F-*glnA*, F-*nblA* und F-Kana linear zu (siehe Abb. 10).

Unter den verwendeten Pufferbedingungen (50 mM NaCl) im Lauf- und Injektionspuffer kam es zu einem fast geradlinigen Bindungsverlauf von NtcA an die DNA, der noch keine Sättigung erkennen ließ. Es konnte kein Unterschied zwischen der Bindung von NtcA an spezifischer (F-*glnA*, F-*nblA*) und unspezifischer DNA bestimmt werden (siehe Abb. 10).

Nach dem Ende der Injektion blieb das Protein stabil an die DNA gebunden und konnte erst durch Injektion mit Regenerationspuffer (1 M NaCl, 50 mM NaOH) wieder entfernt werden.

Das Ergebnis weist auf eine sehr starke unspezifische DNA-Bindung von NtcA hin.

Zur Minimierung von unspezifischer DNA-Bindung von NtcA wird in Gelshift-Experimenten üblicherweise 100 ng/μl Lachsperma-DNA als *Competitor* eingesetzt (Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002a). In den SPR-Bindungsstudien wurde daher versucht, durch die Verwendung von Lachsperma-DNA im Injektionspuffer die unspezifische Bindung von NtcA an die Sensorchip-gebundene DNA zu verringern und eine Unterscheidung zwischen NtcA-abhängiger DNA von unspezifischer DNA zu ermöglichen (siehe Abb. 11).

Die Zugabe von 10 oder 100 ng/μl Lachsperma-DNA im Injektionspuffer bewirkte eine starke Reduktion der Bindung von NtcA sowohl an F-*glnA* als auch an F-Kana (siehe Abb. 11). Eine Unterscheidung zwischen spezifischer und unspezifischer DNA-Bindung konnte demnach durch Zugabe von Lachssperma-DNA nicht erreicht werden.

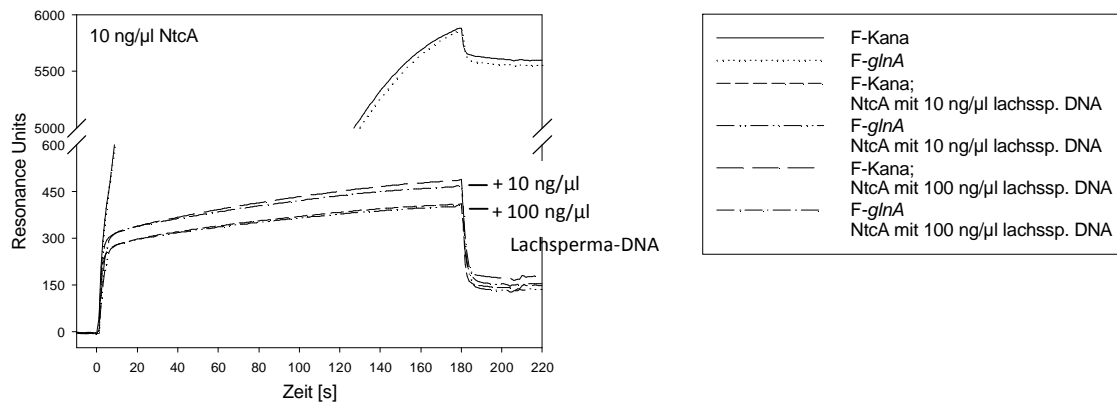


Abbildung 11 Bindung und Dissoziations-SPR von verschiedenen Konzentrationen an NtcA an F-glnA und unspezifischer DNA (F-Kana). In diesen Versuchsansätzen wurde ein Laufpuffer mit 50 mM NaCl verwendet. Injiziert wurden je 10 ng/μl NtcA ohne Lachssperma DNA (lachssp. DNA) oder mit 10 ng/μl bzw. 100 ng/μl Lachssperma-DNA als *competitor*-DNA. Die Proben wurden vorher auf 5 min auf Eis inkubiert. Das Experiment wurde zweimal wiederholt und die Abbildungen zeigen ein repräsentatives Ergebnis.

Eine weitere Möglichkeit, die Spezifität der Bindungsbedingungen zu erhöhen, besteht in der Veränderung der Ionenstärke.

Wurde die NaCl-Konzentration im Injektionspuffer auf 200 mM erhöht, konnte an F-glnA deutlich mehr Resonance Units und somit mehr Bindung von NtcA beobachtet werden, als an unspezifischer DNA (siehe Abb. 12). Die Gesamtmenge an gebundenem NtcA reduzierte sich sowohl bei F-glnA als auch an der unspezifischen DNA. Eine weitere Erhöhung der NaCl-Konzentration verminderte die Bindung von NtcA weiter, bis bei einer NaCl-Konzentration von 275 mM keine NtcA Bindung an F-glnA und an die unspezifische DNA mehr nachweisbar war (Abbildung nicht gezeigt). Bei einer NaCl-Konzentration von 200 mM im Injektionspuffer war eine Unterscheidung zwischen der Bindung von NtcA an spezifischer DNA (glnA) und unspezifischer DNA optimal möglich (siehe Abb. 12).

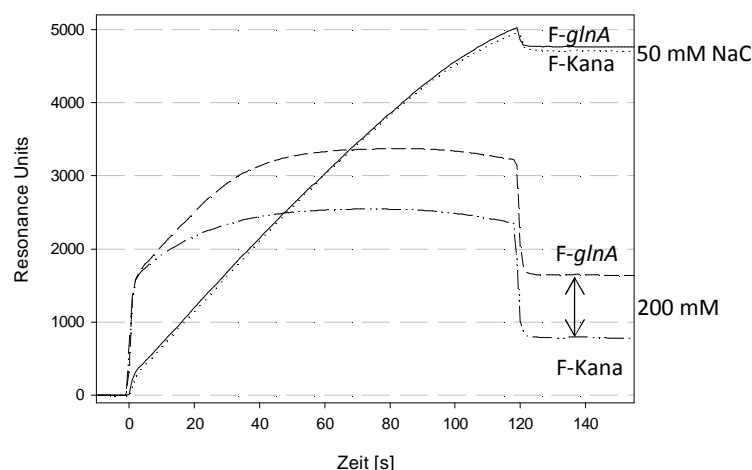
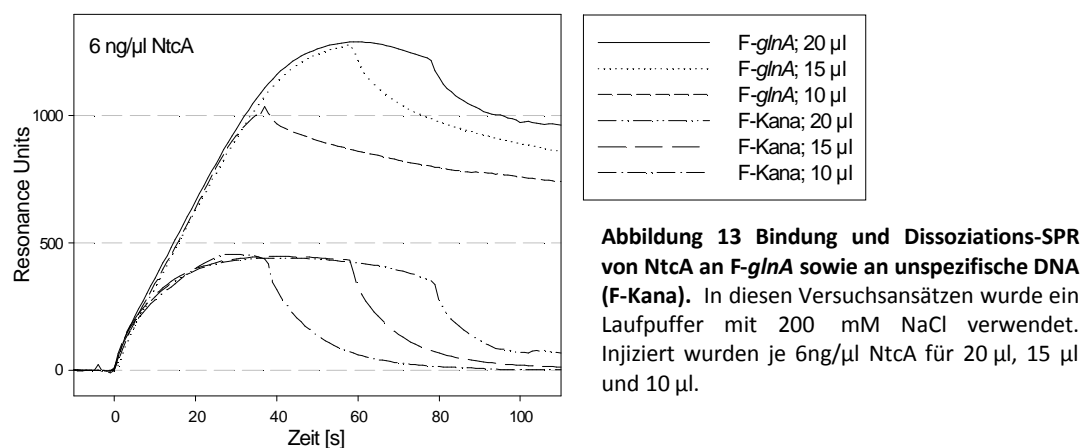


Abbildung 12 Bindung und Dissoziations-SPR von NtcA an F-glnA sowie an unspezifische DNA (F-Kana). In diesen Versuchsansätzen wurde ein Laufpuffer mit 50 mM NaCl verwendet. Injiziert wurden je 6 ng/μl NtcA mit 50 mM oder 200 mM NaCl.
(—) F-glnA; NtcA 50 mM NaCl;
(---) F-glnA; NtcA 200 mM NaCl;
(.....) F-Kana; NtcA mit 50 mM NaCl;
(-.-) F-Kana; NtcA mit 200 mM NaCl

Wurde die NaCl-Konzentration nur im Injektionspuffer auf 200 mM erhöht und im Laufpuffer bei 50 mM beibehalten, entstand ein extrem großer Puffersprung zu Beginn und am Ende der Injektion (siehe Abb. 12). Durch die Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 200 mM im Injektionspuffer und im Laufpuffer konnte der Puffersprung stark verringert werden (vergl. Abb. 12 und 13). Bei 200 mM NaCl im Laufpuffer dissoziierte das NtcA Protein nach Beendigung der Injektion von der DNA (siehe Abb. 13). In den folgenden SPR-Bindungsstudien wurde die NaCl Konzentration im Lauf- und Injektionspuffer daher auf 200 mM festgelegt.



Durch verschieden lange Injektionszeiten wurde die optimale Injektionszeit ausgetestet, bei der im Bindungsverlauf ein Plateau erreicht werden konnte (siehe Abb. 13). Dieses Plateau weist auf ein Gleichgewicht zwischen bindenden und dissoziierenden NtcA Protein hin.

Bei der Injektion von 6 ng/µl NtcA und einer Injektionszeit von 60 s (entsprach 15 µl) konnte sowohl an F-glnA als auch an der unspezifischen DNA ein Plateau beobachtet werden (siehe Abb. 13). Bei einer kürzeren Injektionsdauer von nur 40 s (entsprach 10 µl) bei einer NtcA Konzentration von 6 ng/µl war das Gleichgewicht von bindenden und dissoziierenden NtcA Protein an F-glnA noch nicht erreicht (siehe Abb. 13).

Vázquez-Bermúdez *et al.* (2002a) zeigten, dass die Bindung von NtcA an den *glnA*-Promotor durch $MgCl_2$ und α -Ketoglutarat (α -KG) stimuliert werden kann. In der SPR-Analyse konnte beobachtet werden, dass der Zusatz von 1 mM $MgCl_2$ im Injektionspuffer und Laufpuffer ohne Zugabe von α -KG zu keiner Änderung der Bindung von NtcA an F-glnA und unspezifischer DNA führte (siehe Abb. 14). Die Zugabe von

MgCl₂ in Kombination mit α -KG veränderte jedoch die Kinetik der Bindung. Besonders zu Beginn der Injektion konnte sowohl bei F-*glnA* als auch an der unspezifischen DNA ein steilerer Anstieg der RU's beobachtet werden, was auf eine schnellere Bindung von NtcA an die DNA hinweist. Diese Bedingungen erhöhten jedoch die Bindung von NtcA an die unspezifische DNA (siehe Abb. 14), weshalb für die anschließenden Experimente kein MgCl₂ im Laufpuffer verwendet wurde. Für die nachfolgenden Experimente wurde eine Injektionsdauer von 60 s festgelegt, bei einer NaCl-Konzentration von 200 mM im Injektions- und im Laufpuffer.

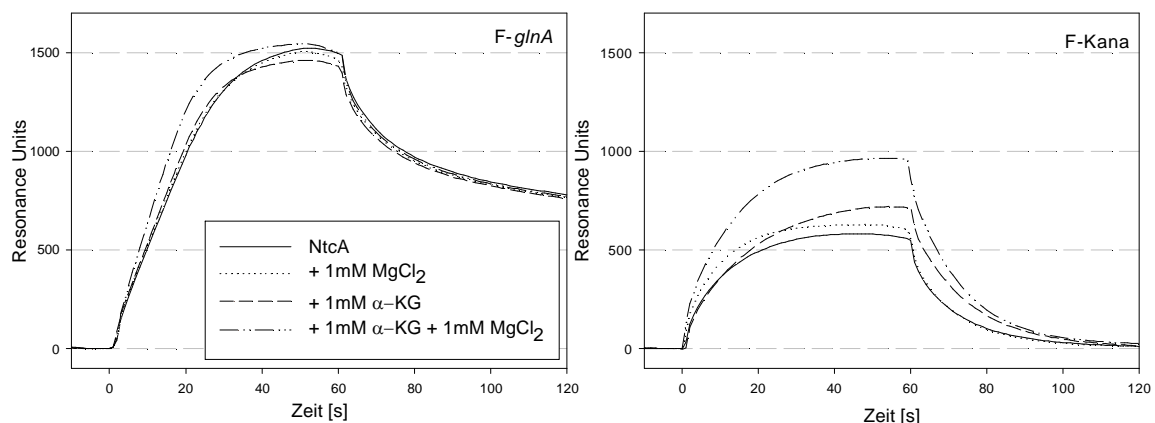


Abbildung 14 Bindung und Dissoziations-SPR von NtcA unter dem Einfluss von α -KG und MgCl₂ an die DNA Fragmente von F-*glnA* sowie an unspezifische DNA (F-Kana). Für das Experiment wurden 8 ng/ μ l NtcA vor der Injektion für 5 min auf Eis ohne oder mit 1 mM α -KG sowie 1 mM MgCl₂ inkubiert.

3.2. Spezifität der Bindung von NtcA an verschiedene Promotor-Fragmente

Die Transkription der Gene *nblA*, *glnB* und *glnN* stehen wie *glnA* unter der Kontrolle von NtcA. Im *nblA* Promotorbereich wurden mehrere putative NtcA Bindestellen nachgewiesen (Luque *et al.*, 2001). Der *glnA*-Promotorbereich weist wie der *glnB*-Promotorbereich eine kanonische NtcA Bindestelle auf (GTA N₈ TAC) (siehe Abb. 15) (Lee *et al.*, 1999), während sich im *glnN*-Promotorbereich eine nicht-kanonische NtcA Bindestelle befindet (GTA N₈ AGC) (Aldehni & Forchhammer, 2006; Sauer *et al.*, 2000). Durch Gel-Retardierungs-Experimente wurde die Bindung von NtcA an den *nblA*- und *glnB*-Promotor nur unzureichend charakterisiert, während eine Bindung von NtcA an die nicht-kanonische Bindestelle im *glnN*-Promotor noch nicht nachgewiesen werden konnte. Durch die SPR-Analyse sollte die Bindung von NtcA an den *nblA*-, *glnB*-, *glnN*- und *glnA*-Promotor untersucht und verglichen werden.

A - Ergebnisse

glnA WT	cctgc aagatttcgt taccaaactt cataagatgg cacactcagg cttgtcagtg ccaat
glnA M1	cctgc aagatttcgt taccaaactt cataagatgg cacactcagg cttgtcagtg ccaat
glnA M2	cctgc aagatttcgt taccaaactt cataagatgg cacactcagg cttgtcagtg ccaat
glnA M3	cctgc aagatttcgt taccaaactt cataagatgg cacactcagg cttgtcagtg ccaat
nblA	ggc gctgctctggg aaagtcacgc caattctgta gcaaccgtag cagga
glnB	cctg atcttttcagc agtggctgat taaaatgtag acagc
glnN	ggggtt caaaggattc ttgggtgcgat cgcaaggagg cgataactta ggcttttcat caaaa
unspez DNA	g ctttgttgaa taaatcgaac ttttgcagag ttgaaggatc agatc
-10 box	
glnA WT (N ₈)	cgccct ccatttttat <u>gta</u> tcagctgt <u>tac</u> aaaagtgccg tttcgggcta cctaggatga
glnA M1	cgccct ccatttttat <u>ATG</u> tcagctgt <u>tac</u> aaaagtgccg tttcgggcta cctaggatga
glnA M2	cgccct ccatttttat <u>gta</u> tcagctgt <u>CAT</u> aaaagtgccg tttcgggcta cctaggatga
glnA M3	cgccct ccatttttat <u>ATG</u> tcagctgt <u>CAT</u> aaaagtgccg tttcgggcta cctaggatga
nblA (N ₉)	gcagc gcgtagatt <u>gta</u> aacaatcact <u>tac</u> acagataaga ttcgagatag cagtaattgac
glnB (N ₈)	gaatt ttcgattgct <u>gta</u> gcagtaact <u>tac</u> aactgtggtc tagtcagcgg tgttaccaaa
glnN (N ₈)	tctgg cccttggttc <u>tgt</u> atctttt <u>tag</u> cgatcgagct ggtcaccatt gagtacgatc
unspez DNA	acgca tcttcccgac aacgcagaccgttc cgtggcaaag caaaagttca aaatcaccaa
glnA WT	aagcggtcag caatgcttgt cttcagttcc tggttgtg
glnA M1	aagcggtcag caatgcttgt cttcagttcc tggttgtg
glnA M2	aagcggtcag caatgcttgt cttcagttcc tggttgtg
glnA M3	aagcggtcag caatgcttgt cttcagttcc tggttgtg
nblA	ggc <u>tcg</u> tcaa gccatagtta ccttggtgtaa caattcagaa agactctgaa acagttgctg
glnB	gagtcgctga cgggggccgt ttgccctct taattgccct ggcttaagga gagttccctt
glnN	aattgactag cttttttggg aaagtccatg agcggcaacg cagcccggt taacgctgtc
unspez DNA	ctggtccacc tacaacaaag ctctcatcaa ccgtggctcc ctcact
nblA	tctgagacag cttgttcac tgcagtgccg gagg
glnB	gaagaagatt gaggcgatta ttctgccgtt caaactggac
glnN	caccagatca ccaatcggga gc

Abbildung 15 DNA-Fragmente der SPR-Analyse von *F-glnA* und Mutationen *F-glnA* M1, *F-glnA* M2, *F-glnA* M3, *F-nblA*, *F-glnB*, *F-glnN* sowie einer *NtcA* unspezifischen DNA. Putative *NtcA* Bindestellen sind unterstrichen, putative -10 Boxen sind eingrahmt. Die Mutationsstellen des *glnA* Promotor-Fragments sind groß geschrieben.

Gleichzeitig kann durch die SPR-Analyse die Kinetik der DNA-Bindungseigenschaften von *NtcA* untersucht werden.

Um die Spezifität des *NtcA*-Bindemotivs näher zu untersuchen, wurden die *NtcA* Bindestellen des *glnA*-Promotors mit Hilfe von Oligonukleotiden und PCR mutiert. Die mutierten Formen M1 (*F-glnA* M1) und M2 (*F-glnA* M2) im *glnA*-Promotorbereich wiesen nur jeweils einen Austausch der palindromischen *NtcA*-Bindestelle auf (siehe Abschnitt A, Material und Methoden). Die Mutation M3 (*F-glnA* M3) ist eine Kombination aus M1 und M2, so dass nun beide halbe *NtcA*-Bindungsstellen mutiert sind.

Die DNA-Fragmente der *glnA*-Wt Promotorregion (*F-glnA*), der *glnA*-Promotor Mutationen M1, M2 und M3 (*F-glnA* M1, *F-glnA* M2, *F-glnA* M3) sowie die DNA-Fragmente der *nblA*- (*F-nblA*), *glnB*- (*F-glnB*) und *glnN*-Promotorregion (*F-glnN*) wurden auf unterschiedliche Fließzellen des SA-Sensorchips geladen. Als Kontrolle auf unspezifische Bindung von *NtcA* an die Sensorchip-gebundene DNA diente ein unspezifisches DNA-Fragment aus dem Vektor pVZ322 (siehe oben), das keinerlei *NtcA*

Bindestelle aufweist (F-Kana). Anschließend wurden Bindungsstudien mit unterschiedlichen Mengen NtcA an die DNA-Fragmente durchgeführt (siehe Abb. 16).

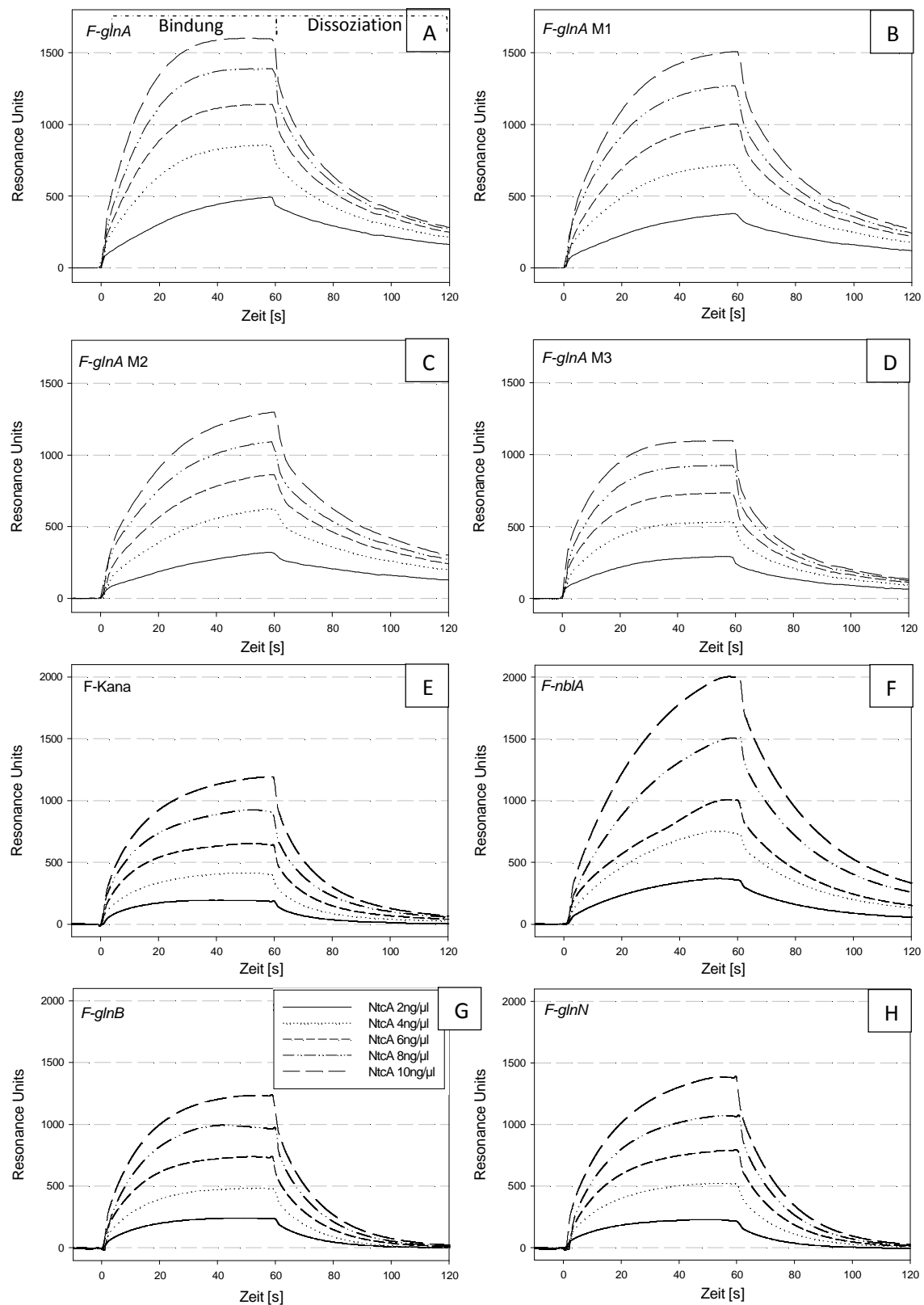


Abbildung 16 Bindung und Dissoziations-SPR von verschiedenen Konzentrationen an NtcA an *F-glnA*, *F-glnA M1*, *F-glnA M2*, *F-glnA M3*, *F-nblA*, *F-glnB*, *F-glnN*, *F-Kana* (s. Material und Methoden). Das Experiment wurde viermal wiederholt und die Abbildungen zeigen ein repräsentatives Ergebnis.

A - Ergebnisse

Die Sensorgramme in Abbildung 16 zeigen die Bindungs- und Dissoziationsphasen von NtcA an die Fragmente F-*glnA*, an die DNA-Fragmente der *glnA* Mutationen F-*glnA* M1, F-*glnA* M2, F-*glnA* M3, an die SA-Sensorchip gebundenen DNA Fragmente von F-*nblA*, F-*glnB* und F-*glnN* mit unterschiedlichen Konzentrationen an injizierten NtcA. Bei allen getesteten DNA-Fragmenten nahm mit steigender Konzentration an NtcA auch die Menge an gebunden NtcA zu (ansteigende Resonance Units).

Nach Beendigung der Injektion begann eine sofortige Dissoziation des NtcA Proteins von der DNA.

Zum direkten Vergleich der verschiedenen DNA-Fragmente wurden die Bindungskurven von 2 ng/μl und 10 ng/μl NtcA übereinander gelegt (siehe Abb. 17)

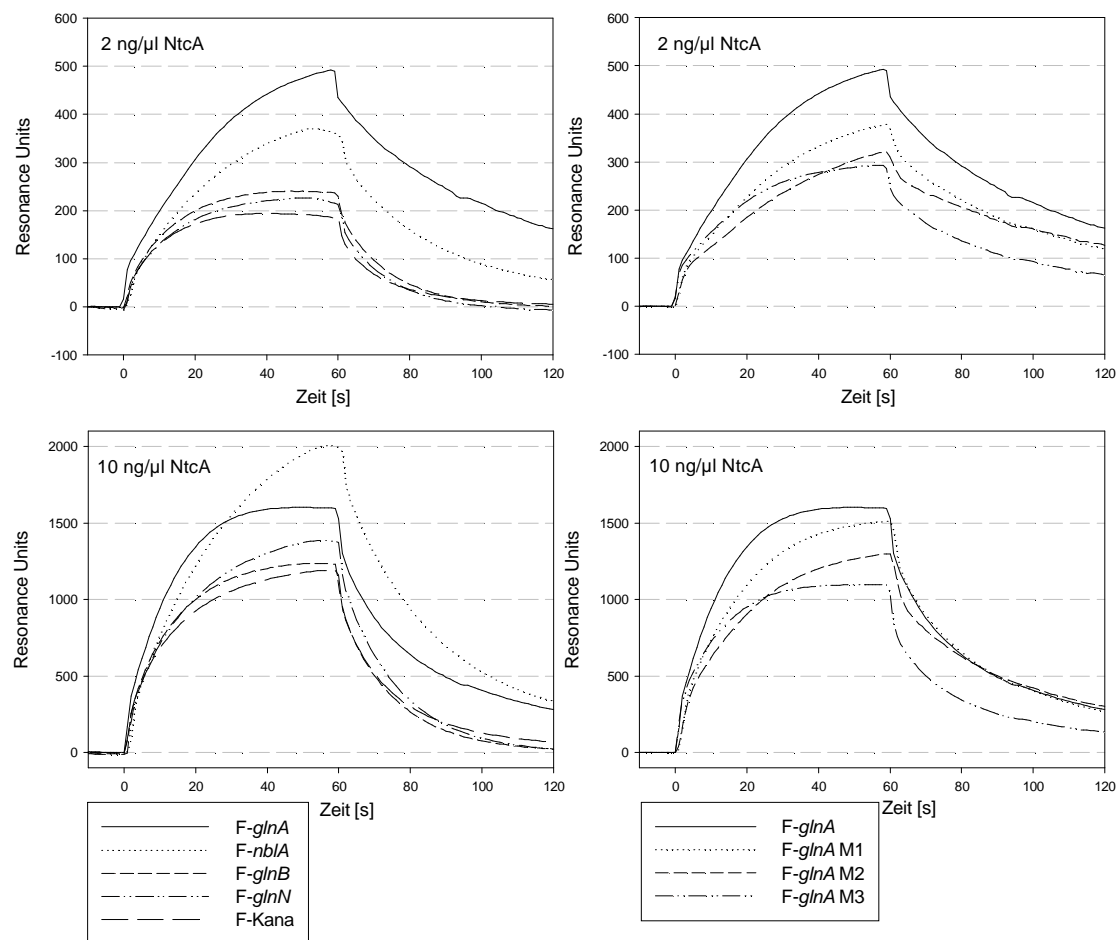


Abbildung 17 Bindung und Dissoziations-SPR von 10 ng/μl bzw. 2 ng/μl NtcA an F-*glnA*, F-*glnA* M1, F-*glnA* M2, F-*glnA* M3, F-*nblA*, F-*glnB*, F-*glnN* und F-Kana (s. Material und Methoden).

Deutliche Unterschiede ließen sich in der absolut gebundenen Proteinmenge, sowie am Verlauf des Sensorgramms beobachten (siehe Abb. 17). Bei einer NtcA-Konzentration

von 10 ng/μl kam es bei der unspezifischen DNA (F-Kana) zu einer Änderung auf 1190 RU, bei F-*nblA* zu 2000 RU, F-*glnB* zu 1235 RU und F-*glnN* zu 1384 RU (siehe Abb. 17, links). An F-*glnA* band im Vergleich zu den Mutationen F-*glnA* M1, F-*glnA* M2 und F-*glnA* M3 stets die größte Menge an NtcA Protein (1590 RU bei 10 ng/μl NtcA) (siehe Abb. 17, rechts). Erwartungsgemäß wurde die geringste Menge an gebundenem NtcA bei F-*glnA* M3 verzeichnet, mit maximal 1090 RU bei einer Konzentration von 10 ng/μl (siehe Abb. 17). Interessanterweise ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen F-*glnA* M1, das maximal 1500 RU bei 10 ng/μl NtcA erreichte, und F-*glnA* M2, das bei gleicher Proteinkonzentration nur maximal 1300 RU erreichte, obwohl bei diesen Fragmente die beiden NtcA-Halbbindungsstellen gleich mutiert wurden (siehe Abb. 7, Abschnitt A, Material und Methoden).

Weitere Unterschiede zeigten sich im Verlauf der Bindung und Dissoziation von NtcA von den DNA-Fragmenten.

Da eine Änderung des SPR-Signals der Veränderung der Massenkonzentration auf der SA-Sensorchip Oberfläche entspricht, lässt sich anhand des Kurvenverlaufs des Sensorgrammes die Interaktion (Bindung und Dissoziation) des injizierten NtcA-Proteins mit der DNA auf der Sensorchip-Oberfläche verfolgen. Aufgrund der immer noch vorhandenen unspezifischen DNA-Bindung ist die Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) nicht möglich. Hingegen ist am Verlauf der Bindung und Dissoziation die Berechnung der Bindungs- (k_a) und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_d) mit Hilfe der *BiaEvaluation* Software 2.0 und der Konzentration des injizierten NtcA möglich (siehe Tab. 4) (Biacore, 2003).

Wie zu erwarten, wurde die geringste Bindungsrate k_a von ca. $250 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ an unspezifischer DNA ermittelt (siehe Tab. 4). An F-*glnN* wurde eine Bindungsrate von $310 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und an F-*nblA* eine Bindungsrate von $530 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt. Obwohl in Abbildung 16 kaum Unterschiede zwischen F-*glnB* und F-*glnN* zu erkennen sind, konnte eine deutlich höhere Bindungsrate von NtcA an F-*glnB* ($17000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ermittelt werden. Eine 250 fach höhere Bindungsrate von NtcA im Vergleich zu F-*nblA* konnte an F-*glnA* ($130.000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ermittelt werden. Trotz geringerer Bindungsrate von NtcA an F-*nblA* im Vergleich zu F-*glnA* band bei gleicher NtcA Konzentration eine größere Menge NtcA an

F-*nblA* (siehe Abb. 17). Trotz Mutation der NtcA Bindestelle im *glnA*-DNA Promotorfragment (F-*glnA* M1 – F-*glnA* M3) wurden hohe Bindungsraten im Vergleich zu den DNA-Fragmenten F-*glnB*, F-*glnN* und F-*nblA* erreicht (siehe Tab. 4), was darauf hinweist, dass die Umgebung des NtcA-Bindemotivs einen Einfluss auf die Anlagerung von NtcA an DNA haben muss.

Die schnellsten Dissoziationsraten k_d wurden für die unspezifische DNA ($0,069 \text{ s}^{-1}$) sowie für F-*glnB* ($0,067 \text{ s}^{-1}$) und F-*glnN* ($0,062 \text{ s}^{-1}$) ermittelt (siehe Tab. 4). Die Dissoziationsrate von NtcA vom F-*glnA* ($0,0031 \text{ s}^{-1}$) war im Vergleich zu unspezifischer DNA um ca. 50 % geringer. Durch die mutierten *glnA*-Fragmente F-*glnA* M1, F-*glnA* M2 und F-*glnA* M3 wurde die Dissoziationsrate im Vergleich zu F-*glnA* nicht erhöht (siehe Tab. 4).

Daher scheint die Geschwindigkeit der Bindung und der Dissoziation von NtcA stark abhängig von der Zusammensetzung der DNA in der Umgebung der NtcA-Bindestelle, da eine Mutation in der kanonischen NtcA-Bindestelle im *glnA*-Promotor keine Verringerung der Bindungsrate oder Erhöhung der Dissoziationsrate nach sich zog.

Tabelle 4 Bindungs- und Dissoziationsrate von NtcA bei der Bindung bzw. Dissoziation von der DNA der Fragmente F-*glnA*, F-*glnA* M1, F-*glnA* M2, F-*glnA* M3, F-*nblA*, F-*glnB*, F-*glnN* sowie an unspezifische DNA (F-Kana) aus dem Promotorbereich von *glnA*, *nsi5*, *glnB*, *nblA*, *glnN* sowie von unspezifischer DNA. Die Konstanten wurden mit Hilfe der *BiaEvaluation* Software ermittelt. Als Grundlage dienten die Bindungskurven von jeweils 10 ng/ μl NtcA.

DNA	Bindungsrate $k_a [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	Dissoziationsrate $k_d [\text{s}^{-1}]$
F- <i>glnA</i>	130.000	0,031
F- <i>glnA</i> M1	80.000	0,030
F- <i>glnA</i> M2	75.000	0,023
F- <i>glnA</i> M3	150.000	0,030
F- <i>glnB</i>	17.000	0,067
F- <i>nblA</i>	520	0,041
F- <i>glnN</i>	310	0,062
F-Kana	250	0,069

3.3. α -Ketoglutarat Effekt auf die Bindungsspezifität von NtcA

Das Effektormolekül α -KG dient in Cyanobakterienzellen als ein Signal der zellulären Kohlenstoff-/Stickstoff-Balance. Vázquez-Bermúdez *et al.* (2002a) zeigte in Gel-Retardierungs Experimenten, dass α -KG die Affinität von NtcA an den *glnA*-Promotor erhöhte. Mit Hilfe der SPR-Analyse sollte sich die Wirkung von α -KG auf die verschiedenen Promotoren zeigen lassen. Für diese Versuche wurde NtcA mit verschiedenen Konzentrationen an α -KG vor der Injektion für 5 min auf Eis inkubiert.

Interessanterweise konnte durch die Inkubation von NtcA mit α -KG unterschiedliche Effekte von NtcA an den einzelnen Promotoren beobachtet werden (siehe Abb. 18). Wie bereits zuvor gezeigt, bewirkt α -KG bereits bei unspezifischer DNA eine Verstärkung der DNA-Bindung von NtcA (siehe Abb. 14 und 18H). Der stärkste Effekt von α -KG trat beim *F-glnB* auf. Während in Abwesenheit von α -KG an *F-glnB* und *F-Kana* ähnliche Resonance Units erreicht wurden (siehe Abb. 17), bewirkte die Zugabe von α -KG eine deutliche Stimulierung der Bindung an *F-glnB* im Vergleich zu *F-Kana* (siehe Abb. 18).

Etwas geringere Stimulierung durch α -KG wie an *F-glnB* konnte an *F-glnN* festgestellt werden (siehe Abb. 18G).

Keine Steigerung der Resonance Units durch α -KG konnte an *F-glnA* und *F-nblA* nachgewiesen werden. Eine Verstärkung der Bindung von NtcA durch α -KG an den *glnA*-Promotor konnte nur durch Gel-Retardierungs-Experimente (EMSA) gezeigt werden (siehe Abb. 19).

Dies zeigt eindrucksvoll, dass durch diese unterschiedlichen Methoden verschiedene Eigenschaften der DNA-NtcA Interaktion gemessen werden. Während bei der SPR-Analyse die Bindung und Dissoziation in Echtzeit verfolgt wird, ergibt der Gelshift eine Aussage darüber, wieviel NtcA unter der Kompetitionsbindung des EMSA-Experiments an die markierte DNA während der Elektrophorese binden kann.

A - Ergebnisse

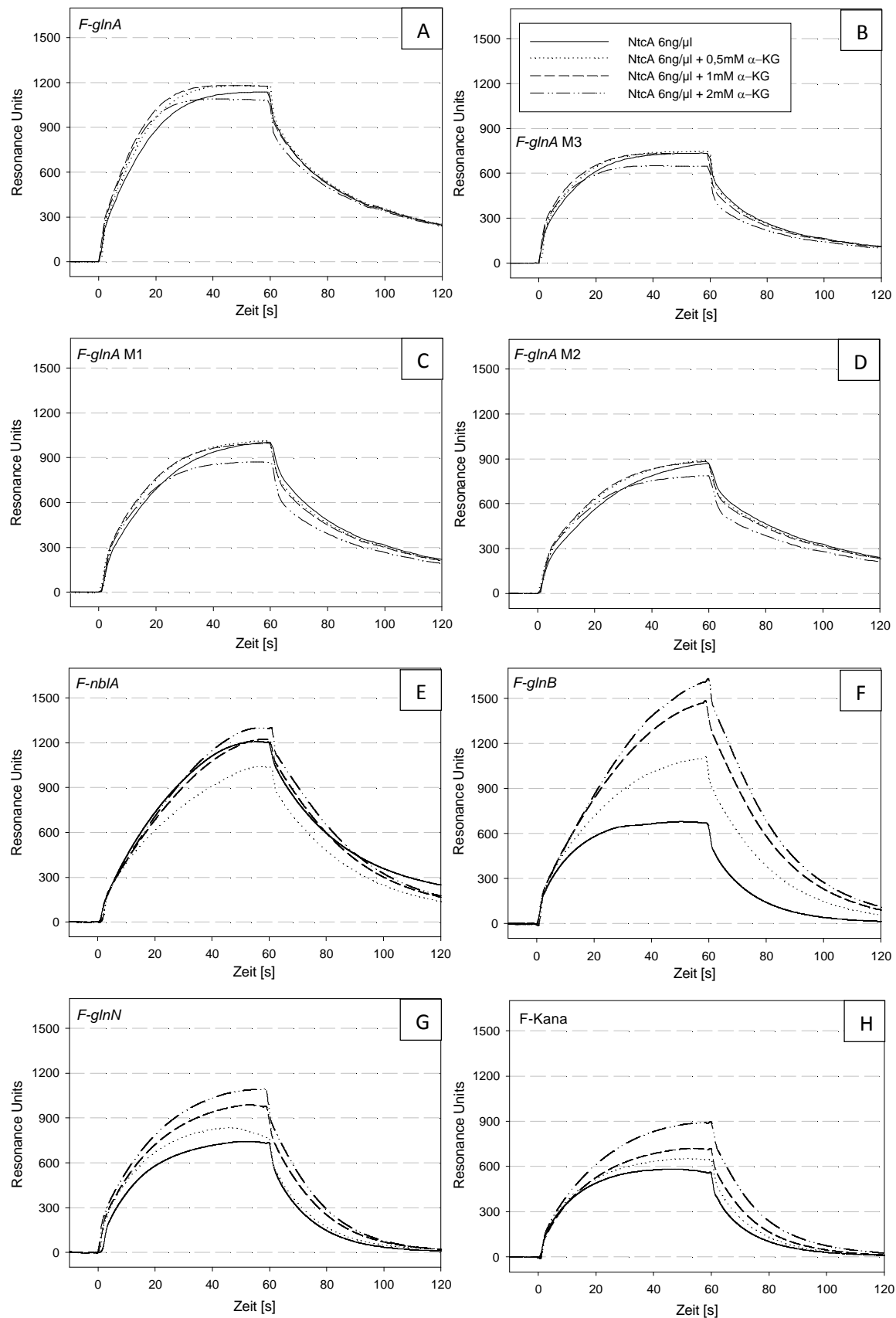


Abbildung 18 Bindung und Dissoziations-SPR von NtcA unter dem Einfluss von α -KG an die Promotor-DNA Fragmente von *F-glnA*, *F-glnA* M1, *F-glnA* M2, *F-glnA* M3 (siehe Abschnitt A, Material und Methoden), *F-nblA*, *F-glnB*, *F-glnN* sowie an unspezifische DNA (F-Kana). Für das Experiment wurden 6 ng/μl NtcA vor der Injektion für 5 min auf Eis ohne oder mit 0,5 mM, 1 mM, 2 mM α -KG inkubiert. Das Experiment wurde dreimal wiederholt und die Abbildungen zeigen ein repräsentatives Ergebnis.

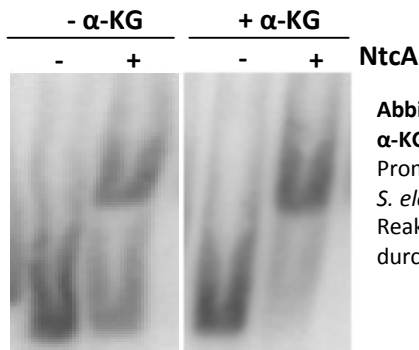


Abbildung 19 Gel-Retardierungs-Analyse zur Untersuchung des Effektes von α -KG auf die Bindung von NtcA an das *glnA*-Promotor-Fragment. Für das *glnA* Promotor-DNA-Fragment wurde der gleiche DNA Bereich aus genomischer *S. elongatus* DNA amplifiziert wie für die SPR-Analyse (Primer ohne Biotin). Der Reaktionsansatz wurde mit 10 ng gereinigtem NtcA und 1,6 mM α -KG durchgeführt. Der jeweils äußere Reaktionsansatz (-) enthielt kein NtcA Protein.

3.4. Wirkung von PipX auf die Bindung von NtcA

In vivo ist PipX an der NtcA-abhängigen Induktion der Gene *glnB* und *glnN* beteiligt (Espinosa *et al.*, 2006a). Durch die SPR-Analyse wurde überprüft, ob die Interaktion von PipX mit NtcA zu einer Änderung in der Bindungsaffinität oder Spezifität von NtcA zur DNA führt. Hierfür wurde NtcA mit und ohne PipX und in Gegenwart und Abwesenheit von α -KG vor der Injektion für 5 min auf Eis inkubiert.

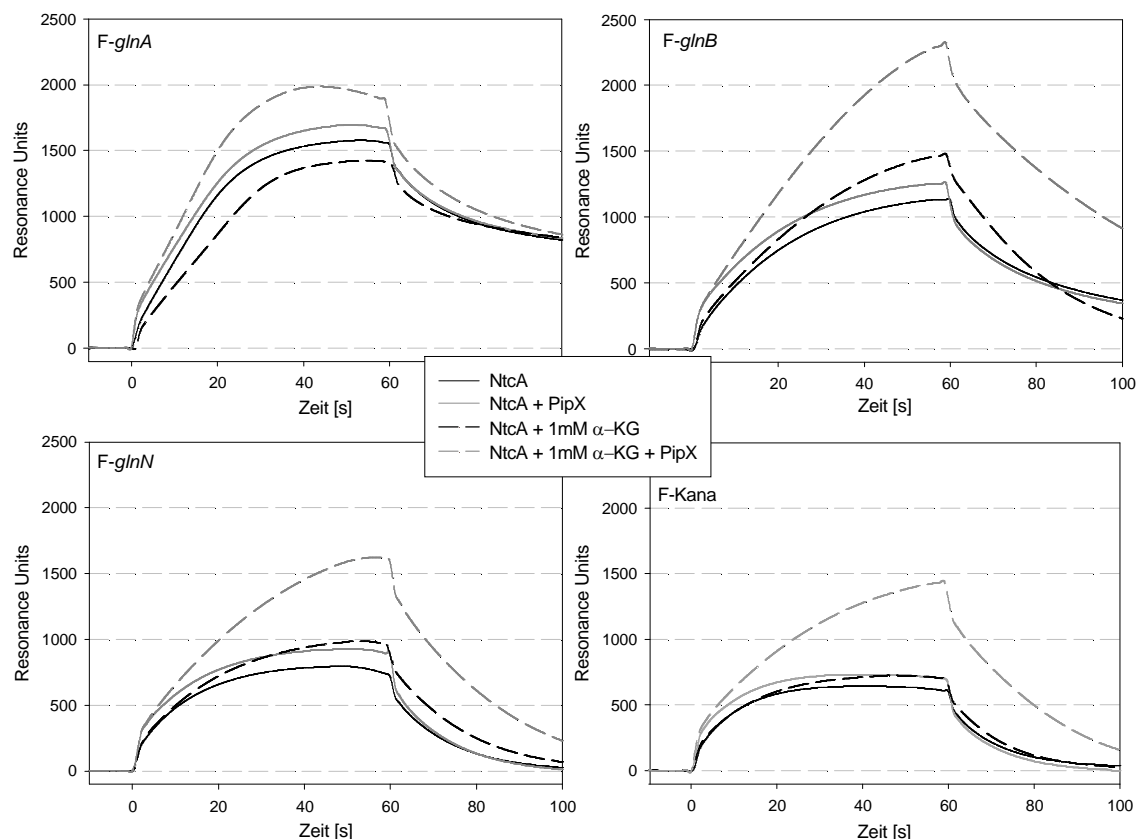


Abbildung 20 Bindung und Dissoziations-SPR von NtcA unter dem Einfluss von α -KG und PipX an die DNA-Fragmente von *F-glnA*, *F-glnB*, *F-glnN* sowie an unspezifische DNA (*F-Kana*). Für das Experiment wurden 6 ng/ μ l NtcA vor der Injektion mit oder ohne PipX (6 ng/ μ l) sowie mit oder ohne 1 mM α -KG für 5 min auf Eis inkubiert. Das Experiment wurde dreimal wiederholt und die Abbildungen zeigen ein repräsentatives Ergebnis.

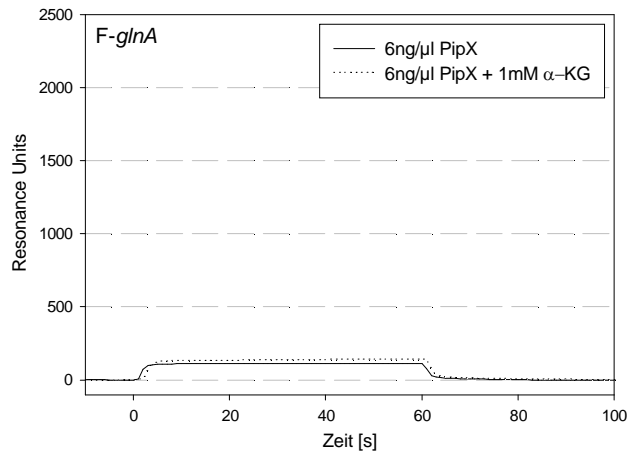


Abbildung 21 Bindung und Dissoziations-SPR von PipX an das DNA-Fragment von F-*glnA*. Für das Experiment wurden 6 ng/μl PipX vor der Injektion mit oder ohne 1 mM KG für 5 min auf Eis inkubiert. Das Experiment wurde dreimal wiederholt und die Abbildungen zeigen ein repräsentatives Ergebnis.

PipX allein war nicht in der Lage an DNA zu binden (siehe Abb. 21). Die Inkubation von PipX mit NtcA ohne α -KG führte zu keiner Änderung der Bindungskurven (siehe Abb. 20). Hingegen konnte eine zusätzliche Bindung von 600 – 700 Resonance Units an allen getesteten DNA-Fragmenten (*glnA*, *glnB*, *glnN*, unspezifische DNA) gegenüber dem Ansatz ohne PipX beobachtet werden.

4. Diskussion

Durch die Bindungsstudien von NtcA an die Sensorchip gebundenen DNA Fragmente konnten spezifische NtcA-abhängige Promotoren von unspezifischer DNA aufgrund der Affinität und Kinetik der Bindung von NtcA unterschieden werden. Eine deutliche Wirkung auf die Bindungsspezifität von NtcA hatte hierbei die NaCl-Konzentration im Inkubationspuffer. Eine niedrige Salzkonzentration führte zu einer sehr stabilen und unspezifischen Bindung von NtcA an die DNA. Eine Erhöhung der Salzkonzentration ermöglichte die Unterscheidung zwischen NtcA-abhängigen Promotoren und unspezifischer DNA. Durch die Erhöhung der Salzkonzentration wurde die Bindung von NtcA an die DNA instabiler und die unspezifische Bindung reduziert.

Eine Bindung von NtcA an DNA war auch ohne Effektormoleküle möglich. Auch durch Gelshift Experimente konnte gezeigt werden, dass eine Bindung von NtcA an den *glnA* Promotor ohne Effektormoleküle möglich ist (Lee *et al.*, 1999; Luque *et al.*, 1994; Maeda *et al.*, 1998; Ramasubramanian *et al.*, 1994), die transkriptionelle Aktivierung der regulierten Gene jedoch α -KG bedarf (Tanigawa *et al.*, 2002; Valladares *et al.*, 2008). In dieser Hinsicht unterscheidet sich NtcA von seinem homologen Transkriptionsfaktor CRP aus *E. coli*, welcher zwar ebenfalls durch ein Effektormolekül (cAMP) reguliert wird, aber nur in Gegenwart von Effektoren an die DNA binden kann (Harrison & Aggarwal, 1990; Kolb *et al.*, 1993).

Die SPR-Studien zeigten eine Affinität von NtcA zu jeder Art von DNA, was in Gelshift Experimenten nicht auftrat (Lee *et al.*, 1999; Tanigawa *et al.*, 2002; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002b). Der Unterschied könnte hierbei in der Dauer des Experimentes liegen. Während im Gelshift Experiment das Ergebnis erst nach erfolgter Gelelektrophorese zu sehen ist, wird die Bindung in der SPR-Analyse sofort beobachtet. Die Bindung des Proteins an die DNA ist bei den angewandten Salzkonzentrationen instabil und NtcA löst sich rasch wieder von der DNA. An den NtcA-abhängigen Promotoren bindet eine größere Menge an Protein als an der unspezifischen DNA. Zusätzlich war die Dissoziationsrate von NtcA von der unspezifischen DNA doppelt so hoch wie vom *glnA*-

Promotor. Ein Gelshift könnte sich somit aus der größeren Menge an gebundenen NtcA und langsamerer Dissoziation von NtcA von der DNA ergeben.

PipX ist ein kleines monomeres Protein mit einer Masse von 10,5 kDa, welches in Gegenwart von α -KG an NtcA bindet (Espinosa *et al.*, 2006a). *In vivo* konnte gezeigt werden, dass PipX für die Aktivierung NtcA-abhängiger Gene benötigt wird. Daher wird vermutet, dass PipX als transkriptioneller Co-Aktivator von NtcA wirkt (Espinosa *et al.*, 2007). Der Mechanismus ist noch unbekannt. Durch die SPR-Experimente sollte die Wirkung von PipX auf die Bindung von NtcA an die DNA getestet werden. Es konnte gezeigt werden, dass ein Komplex aus NtcA und PipX in Gegenwart von α -KG an die DNA binden kann.

Im Bereich des *nblA*-Promotors wurden mehrere putative NtcA-Bindestellen nachgewiesen (Luque *et al.*, 2001; Luque & Forchhammer, 2008). Trotz geringerer Bindungsrate von NtcA an den *nblA*-Promotor im Vergleich zum *glnA*-Promotor, konnten deutlich größere Mengen NtcA an den *nblA* Promotor binden. Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass tatsächlich mehrere der putativen Stellen besetzt werden können. Für die Aktivität von NtcA ist jedoch nicht die absolute Menge an NtcA entscheidend. So führte die Überproduktion von NtcA in *S. elongatus* Zellen weiterhin zur stickstoffabhängigen Regulation von *glnA* und des *nir* Operons (Luque *et al.*, 2004). Somit muss zusätzlich *in vivo* eine Regulation der Aktivität von NtcA erfolgen. Möglicherweise könnte die Regulation der NtcA Aktivität über PipX erfolgen. Interessant wäre es daher zu testen, ob sich die Bindung von PipX an NtcA positiv auf die transkriptionelle Aktivierung auswirkt.

Eine Abweichung von der kanonischen NtcA Bindemotiv, wie zum Beispiel bei *glnN* und bei *nblA*, führte zu geringerer Affinität von NtcA. Andererseits garantiert ein perfektes kanonisches Bindemotiv keine starke NtcA Bindung, wie im Fall des *glnB*-Promotors zu beobachten war. Die Bindungsrate des *glnB*-Promotors wurde mit $17.000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt und war somit deutlich kleiner als bei *glnA* ($130.000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Dieser starke Unterschied wurde auch in Gelshift-Experimenten beobachtet (Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002a). Einen wesentlichen Beitrag zur Bindungsaffinität könnten neben dem

eigentlichen NtcA Bindemotiv die benachbarten Sequenzen leisten. Um diese Frage zu klären, wurde im *glnA*-Promotor das NtcA Bindemotiv systematisch mutiert. An die im NtcA-Bindemotiv mutierten DNA Fragmente band deutlich weniger NtcA als an dem *glnA*-Wt Promotorfragment. Die Mutationen im NtcA Bindemotiv hatten jedoch keine Auswirkung auf die Bindungs- und Dissoziationsraten von NtcA. Daraus kann gefolgert werden, dass die benachbarten Sequenzbereiche einen großen Einfluss auf die Affinität zu NtcA ausüben. Durch Mutation der Umgebung des *glnA*-Promotors konnte von Vázquez-Bermúdez *et al.* (2002b) gezeigt werden, dass AT-reiche flankierende Basenpaare positiv auf die NtcA-Bindung wirken. Auch bei dem NtcA homologen Protein CAP aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass bei Änderung der flankierenden Sequenzen die Affinität zur DNA bis zu 10 fach verringert wird (Harrison & Aggarwal, 1990) und auch die Basenpaare im Zentrum des Palindroms einen Einfluss auf die Affinität haben (Gunasekera *et al.*, 1992). Das HTH-Motiv des CAP Proteins bindet an eine palindromische Bindestelle, die sich in der großen Furche der DNA befindet (Harrison & Aggarwal, 1990). Die DNA Konformation ist abhängig von der Basenpaarfolge (Coll *et al.*, 1987). So können sich zum Beispiel in der großen Furche der DNA Wasserstoffbrückenbindungen bilden, wenn zwei Adenine aufeinander folgen. Die resultierenden diagonalen oder gegabelten Wasserstoffbrückenbindungen in AT-Basenpaarfolgen führen zur Versteifung der DNA. Besonders auffällig sind im *glnA*-Promotorbereich von *S. elongatus* die langen AT-Strecken, die das Palindrom umgeben (vergl. Abb. 15). Dies könnte die Bindung von NtcA an die DNA erleichtern und gleichzeitig die Affinität zu NtcA erhöhen. Möglicherweise wirkt sich auch eine Verringerung des AT-Gehaltes der flankierenden Basenpaare auf die transkriptionelle Aktivierung der Gene aus, wie es für die Klasse II der CAP-abhängigen Promotoren gezeigt werden konnte (Busby & Ebright, 1997). Für *S. elongatus* wurde bereits gezeigt, dass die Aktivierung des *glnA*-Promotors von zwei Mechanismen abhängig ist. Neben der Bindung von NtcA muss durch die Wirkung von α -KG die Transkription aktiviert werden (Tanigawa *et al.*, 2002). Auch in *Anabaena* sp. PCC 7120 wurde gezeigt, dass für die Bildung eines *open complex* und somit die Voraussetzung der Transkription, die Bindung von NtcA und α -KG notwendig ist (Valladares *et al.*, 2008).

α -KG hatte in den SPR-Bindungsstudien keinen Einfluss auf die Affinität von NtcA an den *glnA*-Promotor mit perfektem kanonischem Bindemotiv. Auch nach Mutagenisierung

des NtcA Bindemotivs im *glnA*-Promotor konnte kein Effekt von α -KG auf die Affinität von NtcA nachgewiesen werden.

Wie der *glnA*-Promotor besitzt der *glnB*-Promotor eine perfekte kanonische Bindestelle. Im Gegensatz zum *glnA*-Promotor wurde die Affinität von NtcA an den *glnB*-Promotor durch α -KG signifikant erhöht. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die Sequenzen, die das kanonische NtcA-Bindepalindrom flankieren, einen wesentlichen Einfluss auf die Bindung von NtcA haben. Möglicherweise bedingt der Sequenzkontext des NtcA-Bindepalindroms im *glnA*-Promotor eine DNA Konformation, die eine optimale NtcA-Bindung bereits in Abwesenheit von α -KG erlaubt. Vermutlich erfolgt durch die Bindung von α -KG eine Konformationsänderung von NtcA, die eine Anlagerung an die weniger optimal strukturierte DNA erleichtert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Bindung von NtcA an die DNA somit abhängig vom NtcA-Bindemotiv und den umgebenden Sequenzen ist. Die Wirkung von α -KG auf die NtcA Anlagerung an die DNA ist wiederum von den umgebenden Sequenzen des NtcA-Bindemotivs abhängig.

Abschnitt B

Transkriptom-Analyse

von *Synechococcus elongatus* PCC 7942

Wildtyp

im Vergleich zur

NblR-, NtcA- und PipX-Mutante

während Stickstoffmangel

2. Material und Methoden

2.1. Cyanobakterienstämme, Kultivierungsbedingungen und Ernte

S. elongatus Stämme wurden in 100 ml BG11 Ammonium-Medium (BG11^A) (siehe Abschnitt C, Material und Methoden) mit 5 mM NaHCO₃ in 500 ml Schikanekolben, wie in Abschnitt C Material und Methoden beschrieben, kultiviert. Zur NblR-, NtcA- sowie der PipX-Mutante wurden 25 µg/ml Kanamycin zur Aufrechterhaltung der Mutation gegeben. Die Anzucht erfolgte photoautotroph bei 28 °C bei einer Lichtintensität von 40 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ (Lumilux de Lux, Daylight, Osram). Zur optimalen Belüftung wurden die Kulturen mit Silikonschaumkappen versehen und auf einem Schüttler bei 130-140 rpm inkubiert. Für die Induktion von Mangelbedingungen wurden die Cyanobakterien bis zu einer exponentiellen Wachstumsphase OD₇₅₀ 0,7 in BG11^A Medium schüttelnd inkubiert. Durch Vakuumfiltration über einen Membranfilter (0,45 µm HV, Millipore) wurde das Anzuchtmedium der Zellen durch zweimaliges Waschen mit stickstofffreiem (BG11⁰) Medium ausgetauscht. Zur Kontrolle wurde ein Teil der Zellen wieder im BG11^A-Medium resuspendiert. Die Zelldichte wurde auf OD₇₅₀ von 0,4 - 0,5 eingestellt und die Zellen wieder unter Standardbedingungen (40 µmol Photonen m⁻² s⁻¹, 28 °C) schüttelnd inkubiert. Nach 6 h und 24 h wurden 30 ml der Zellkultur in 50 ml Zentrifugenbecher überführt, die halbhoch mit Eis gefüllt waren. Anschließend wurden die Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei 7500 rpm und 4 °C geerntet. Die Zellsedimente wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert. Jedes Experiment wurde in drei biologischen und zwei technischen Replikaten durchgeführt.

2.2. Herstellung der Deletions-Mutanten

Die Deletions-Mutanten Nsi5, MerR, 2150, 2149 und 2148 wurden, wie in Abschnitt C Material und Methoden beschrieben, hergestellt.

2.3. Isolierung der Gesamt-RNA aus *S. elongatus* Wildtyp und NblR-, NtcA- und PipX-Mutanten

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte wie in Abschnitt C Material und Methoden (RNA-Isolierung modifiziert nach Qiagen) beschrieben.

2.4. Mikroarray und Mikroarray-Datenanalyse

Die cDNA Synthese, dye-labeling sowie die Mikroarray Hybridisierung und Bildaufnahme und Analyse erfolgten wie in Nodop *et al.* (2008) beschrieben.

2.5. Nachweis eines polycistronischen Transkripts des *nsi5*-Operons

Die semi-quantitativen RT-PCR wurde mit dem *OneStep RT-PCR Kit* (Qiagen), wie in Abschnitt C Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 5 aufgeführt. Durch RT-PCR wurde überprüft, ob ein gesamtes Transkript der Gene *nsi5*, *merR*, 2150, 2149 bis 2148 (ca. 4300 bp) existiert. Die Oligonukleotide für die PCR wurden so gewählt, dass sich die einzelnen bei der RT-PCR entstehenden Fragmente (A-D), um jeweils ca. 700 bp überschneiden (siehe Abb. 22) und somit die gesamte Länge des möglichen Transkripts über 4300 bp abdecken. Als Template für die RT-PCR wurde RNA von *S. elongatus* Wt Zellen nach 6 h Stickstoffmangel verwendet.

Die Expression der Gene *nsi5*, *merR*, 2150, 2149 und 2148 in den jeweiligen Knockout-Mutanten Nsi5, MerR, 2150, 2149 und 2148 wurde durch RT-PCR überprüft. Die verwendeten Oligonukleotide für die Fragmente (A) bis (F) (siehe Abb. 22) sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Als Template für die RT-PCR wurde RNA von *S. elongatus* Wt Zellen nach 6 h Stickstoffmangel verwendet.

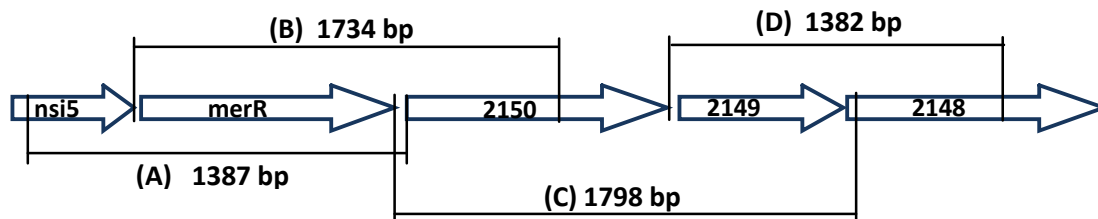


Abbildung 22 Schema der Bindestellen der Primerpaare der RT-PCR zur Bestimmung der Operonstruktur. Die verwendeten Primerpaare (A) – (D) sind in Material und Methoden angegeben. Als *Template* wurde 60 ng RNA von *S. elongatus* Wt Zellen nach 6 h Stickstoffmangel verwendet.

2.6. Oberflächen-Plasmon-Resonanz Analyse (Biacore)

Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz Analyse wurde wie in Abschnitt A Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Die biotinylierte DNA für den *nsi5* Promotorbereich wurde mit den bioninylierten Oligonukleotiden rev-*nsi5*-Prom und for-*nsi5*pr-biot aus genomischer *S. elongatus* DNA durch PCR hergestellt und die Bindung von NtcA mit und ohne Effektormoleküle überprüft.

Tabelle 5 verwendete Oligonukleotide für die Herstellung biotinylierter Oligonukleotide des *nsi5* Promotorbereichs für die Biacore-Bindungs-Analyse sowie verwendete Oligonukleotide für die semi-quantitative RT-PCR.

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5' ... 3'	Modifikation:
Herstellung biotinylierter Oligonukleotide:		
For_ansi5pr-biot	5'-TCG CGG TCA ACT AGG TAA AAC A-3'	5'-Biotin
Rev_ansi5-Prom	5'-ATC TGC AAT TAG AAC GGT GGC T-3'	
semi-quantitative RT-PCR:		
Fragment (A):	(siehe Abb. 22)	
For-ansi5	5'-CTC GTC AAC CTT CTC CAA GC-3'	
Rev_up_02d	5'-CGT TGA CTT AGG CAT GGA GAT-3'	
Fragment (B):		
Fw_dn_nsi5	5'-TTC AAG TTG GTT TTT TAG GAT TCT-3'	
Rev_dn_merR	5'-TGC ATG CCC AGA CTG TTG AC-3'	
Fragment (C):		
Fw_dn_merR	5'-GAG GAC TAT CTC CAT GCC TAA-3'	
Rev_dn_02d	5'-GCTCATGCGGCTTGACGAC-3'	
Fragment (D):		
Fw_dn_02d	5'-TCC CTG TCT CTT CTT ATT TGT C-3'	
Rev_dn_03d	5'-GAA CAT CAC GGC GGT ACC AA-3'	

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Experimentelles Design

S. elongatus Wildtyp-Zellen verwandeln sich nach Stickstoffentzug in unpigmentierte Überdauerungszellen, die in der Lage sind längere Mangelperioden zu überleben. Der bei diesem Differenzierungsprozess erfolgende Abbau der photosynthetischen Pigmente ist als Prozess der Chlorose bekannt (Collier & Grossman, 1992). Zu den regulatorischen Proteinen im Differenzierungsprozess gehören die Faktoren NblR, NtcA sowie PipX (Espinosa *et al.*, 2006a; Sauer *et al.*, 1999; Schwarz & Grossman, 1998). Die Beteiligung dieser Faktoren an der differenziellen Genregulation, die durch einen Stickstoffmangel hervorgerufen wird, sollte durch Mikroarray-Analysen charakterisiert werden. Hierfür wurden die Zellen des *S. elongatus* Wildtyps und der NblR-, NtcA- und PipX-Mutante in ammoniumhaltigem und stickstofffreiem BG11 Medium kultiviert. In den Mikroarray-Analysen wurden experimentell die Veränderungen im Transkriptom des Wildtyps nach 6 h und 24 h Stickstoffmangel gegenüber dem Transkriptom des Wildtyps in ammoniumhaltigem Medium bestimmt (siehe Abb. 23, vertikale Analyse). Ein Vergleich des Transkriptoms nach 6 h und 24 h Stickstoffmangel mit dem Transkriptom in ammoniumhaltigem Medium wurde auch mit der NtcA-, NblR- und PipX-Mutante durchgeführt. Jedes Experiment wurde in drei biologischen und zwei technischen Replikaten und einem dy-swap Experiment durchgeführt. Die resultierenden Daten der Mikroarray-Analyse des Wildtyps wurden mit den Daten der NblR-, NtcA- und PipX-Mutante verglichen.

Die Veränderungen im Transkriptom werden durch den M-Wert angegeben. In der Auswertung der Transkriptomdaten wurden nur M-Werte betrachtet, deren p-Wert $\leq 0,051$ war. Durch bereits bekannte Expressionsmuster im Stickstoffmangel wurde der Schwellenwert des M-Wertes, der eine Auswahl der signifikanten gemessenen Veränderungen erlaubt, auf $\geq 0,75$ und $\leq -0,75$ festgelegt. Als spezifisch induziert wurden die Gene gewertet, deren M-Wert $\geq 0,75$ war, was einem „Fold change“ ($2^{\text{M-Wert}}$) von $\geq 1,68$ entsprach. Als spezifisch reprimiert wurden die Gene gewertet, deren M-Wert $\leq -0,75$ war, was einem „Fold change“ von $\leq 0,59$ entsprach.

Des Weiteren wurde das Transkriptom des *S. elongatus* Wildtyps verglichen mit dem Transkriptom der NtcA-, NblR- und PipX-Mutante in Ammoniummedium, sowie das Transkriptom des Wildtyps nach 6 h und 24 h Stickstoffentzug verglichen mit dem Transkriptom der NtcA-, NblR-Mutante nach 6 h und 24 h Stickstoffentzug (siehe Abb. 23, horizontale Analyse).

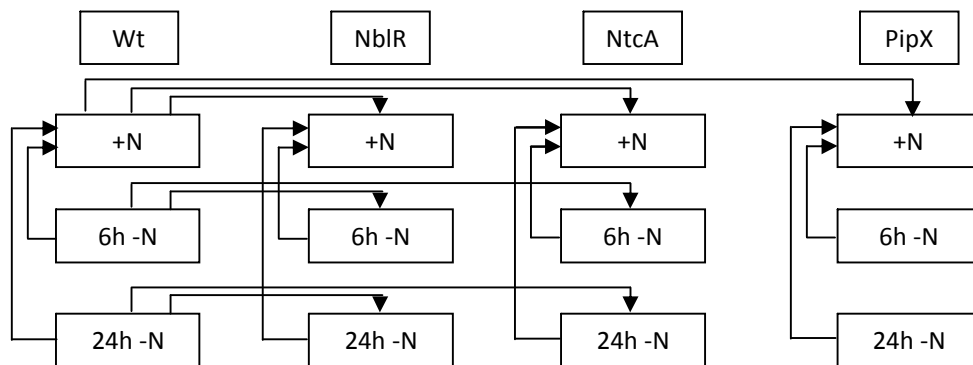


Abbildung 23 Übersicht der durchgeführten Mikroarray Experimente. Die Pfeile zeigen die in einem Mikroarray-Experiment miteinander verglichenen Proben.

3.2. Unterschiede im Transkriptom der NblR-Mutante und der NtcA-Mutante im Vergleich zum Wildtyp unter Standardwachstumsbedingungen

3.2.1. NtcA-Mutante

Unter Standardwachstumsbedingungen mit Ammonium als Stickstoffquelle wurde das Transkriptom des Wildtyps mit der NtcA-Mutante verglichen (siehe Abb. 23, horizontale Analyse). In der NtcA-Mutante wurden 35 Gene schwächer und 21 Gene stärker transkribiert als im Wildtyp (siehe Tab. 6 und 7), die im Folgenden nach Stoffwechselfunktion gegliedert, beschrieben werden.

A) Stickstoff-Metabolismus

Im Vergleich zum Wildtyp wurde in der NtcA-Mutante unter Ammoniumbedingungen eine geringere Transkriptmenge des *amt1* Gens, das für den Ammoniumtransporter kodiert, sowie eine geringere Transkriptmenge des Gens der Glutamin Synthetase *glnA* festgestellt (siehe Tab. 6). Eine schwächere Expression des *amt1* Gens unter Ammoniumwachstumsbedingungen in der NtcA-Mutante konnte auch durch Northern Blot Analysen gezeigt werden (Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002c).

Im Vergleich zum Wt wurde in der NtcA-Mutante eine deutlich erhöhte Menge an Transkript für das *gifB* Gen festgestellt (siehe Tab. 7).

Das *gifB* Gen kodiert für den Inaktivierungsfaktor IF17. In *Synechocystis* wird die Aktivität der Glutamin Synthetase (GS) durch die Bindung zweier Polypeptide (IF7 und IF17) reguliert. Die Bildung eines GS-IF Komplexes führt zur Inaktivierung der GS (Garcia-Dominguez *et al.*, 1999). IF7 und IF17 sind homologe Proteine, die durch die Gene *gifA* und *gifB* kodiert werden. In *S. elongatus* kodiert nur das homologe *gifB* Gen für den Inaktivierungsfaktor IF17. In *Synechocystis* wird die Expression der beiden Gene *gifA* und *gifB* in Abwesenheit von Ammonium durch NtcA reprimiert (García-Domínguez *et al.*, 2000). Bei Wachstum mit Ammonium als Stickstoffquelle sollte daher *gifB* nicht reprimiert werden. Durch die Mikroarray-Daten konnte jedoch gezeigt werden, dass die Menge an *gifB* Transkript im Wildtyp deutlich geringer war, als in der NtcA-Mutante. Dies deutet darauf hin, dass im *S. elongatus* Wildtyp selbst bei Ammoniumbedingungen *gifB* durch NtcA reprimiert wird.

Vaga-Palas *et al.* (1992) konnten in *S. elongatus* zeigen, dass die GS-Aktivität in der NtcA-Mutante in Ammoniummedium im Vergleich zum Wt verringert ist. Dies könnte durch die geringere Expression des *glnA* Gens und der höheren Expression des GS Inaktivierungsfaktors IF 17 (*gifB*) hervorgerufen werden.

Auch die mRNA-Menge von *ama* (N-Acyl-L-Aminosäure Amidohydrolase) war in der NtcA-Mutante gegenüber dem Wt deutlich erhöht. N-Acyl-L-Aminosäure Amidohydrolase ist am Aminosäure Metabolismus beteiligt.

B) Kohlenstoff-Metabolismus und Respiration

In *S. elongatus* sind zwei spezialisierte NDH-1 Komplexe an der Aufnahme von CO₂ beteiligt (siehe Abb. 24) (Badger *et al.*, 2006; Battchikova & Aro, 2007; Price *et al.*, 2002). Der NDH-1MS Komplex besteht aus dem zentralen NDH-1M Komplex und den Untereinheiten NDHF3/NDHD3/CupA(chpY) (siehe Abb. 24) und ist an der hochaffinen Aufnahme von CO₂ in *S. elongatus* (Maeda *et al.*, 2002), *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Klughammer *et al.*, 1999) und *Synechocystis* (Ohkawa *et al.*, 2000; Shibata *et al.*, 2001)

beteiligt. Das *ndhD3* Gen liegt mit den Komponenten *ndhF3* und *chpY* in einem Operon (siehe Abb. 25), dessen Produkte zusammen mit NDH-1M den spezialisierten NDH-1MS Komplex zur hochaffinen CO₂-Aufnahme bilden (siehe Abb. 24) (Badger *et al.*, 2006).

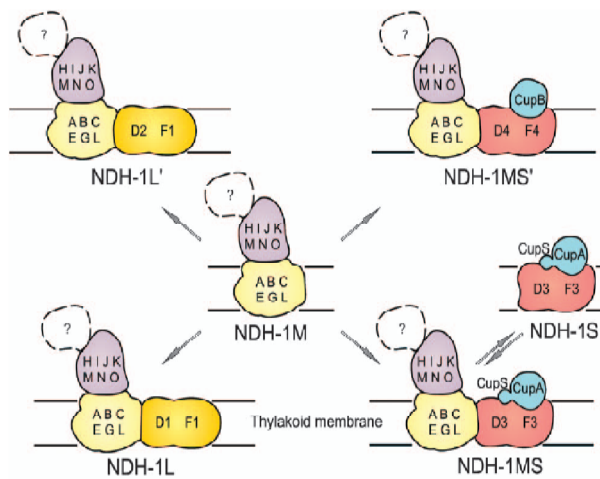


Abbildung 24 Darstellung der NDH-1 Komplexe der Cyanobakterien. Die Abbildung ist Battchikova & Aro, 2007 entnommen. NDH- 1L und -1L' Komplexe sind an der Respiration und dem zyklischen Elektronen-transport um PSI beteiligt, während die NDH-1MS und -1MS' Komplexe an der CO₂ Aufnahme beteiligt sind. Der NDH-1MS ist an der hochaffinen CO₂-Aufnahme, der unter niedrigen CO₂-Bedingungen induziert wird, beteiligt. Der NDH-1MS' Komplex ist dagegen an der konstitutiven niederaffinen CO₂-Aufnahme involviert. Der Basiskomplex NDH-1M ist Bestandteil von NDH-1L (-1L') und -1MS (-1MS'). Die vier NDH Komplexe unterscheiden sich in den membrangebundenen NdhD und NdhF Proteinen. Der NDH-1MS und -1MS' Komplex besteht aus einer zusätzlichen Cup Domäne.

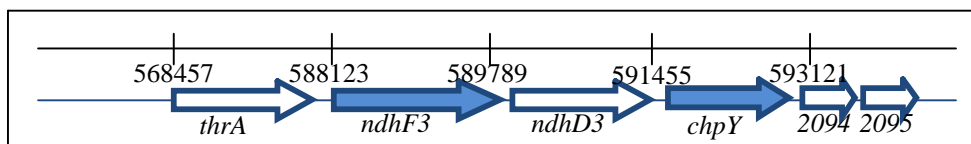


Abbildung 25 Ausschnitt des *S. elongatus* Chromosoms mit den Genen des NDH-1MS Komplexes, deren Transkription durch Stickstoffmangel induziert wird. Die Gene *ndhF3*, *ndhD3* und *chpY* liegen in einem Operon (Badger *et al.*, 2006). Die Expression des *ndhD3* Genes konnte aufgrund des hohen p-Wertes nicht bestimmt werden. Im Vergleich zum Wt war die Transkriptmenge von *ndhF3* und *chpY* in der NtcA-Mutante deutlich reduziert.

Die Transkripte von *ndhF3* und *chpY* waren in der NtcA-Mutante im Vergleich zum Wt um ca. 50 % reduziert (siehe Tab. 6). Das *ndhD3* Gen wurde aufgrund zu hoher p-Werte aus der Liste genommen.

Neben den Elementen der CO₂-Aufnahme war auch die Expression der Glyceraldehyd-3P Dehydrogenase (*gap*), ein Enzym der CO₂-Fixierung im Calvin-Zyklus in der NtcA-Mutante im Vergleich zum Wt reduziert (siehe Tab. 6).

Eine Ursache für die verringerte Expression von Genen der CO₂-Fixierung könnte in der veränderten C/N Balance aufgrund verringerter Ammoniumassimilation der GS-Aktivität bestehen (vergl. B 3.2.1.A). Eine Anpassung des Kohlenstoff-Metabolismus könnte die C/N Balance wieder herstellen.

Des Weiteren wurde in der NtcA-Mutante im Vergleich zum Wt eine reduzierte mRNA-Menge von *ctaC* und *ctaE*, die für Untereinheiten der Cytochrom C Oxidase aa_3 kodieren, nachgewiesen (siehe Tab. 6).

In der NtcA-Mutante war ebenfalls die mRNA-Menge von *katG* (Katalase-Peroxidase) und einer putativen Gluthation-Peroxidase (1698) im Vergleich zum Wt in Ammoniummedium verringert (siehe Tab. 6).

Die Cytochrom C Oxidase ist das terminale Enzym der Elektronentransportkette der Atmung, wobei Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden. Die reduzierte Transkriptmenge von *ctaC* und *ctaE* in der NtcA-Mutante deutet somit auf eine schwächere Atmungsaktivität hin. Eine verringerte Elektronenübertragung auf Sauerstoff sollte die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) vermindern. Eine Schutzwirkung vor ROS üben Katalase und Peroxidase aus (Perelman *et al.*, 2003; Tichy & Vermaas, 1999). Eine verminderte Bildung von ROS in der NtcA-Mutante würde weniger Entgiftungsmechanismen in Form von Katalase und Peroxidase benötigen. Dadurch könnte die Expression von Katalase und Peroxidase reduziert werden.

In den Mikroarray-Analysen konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Menge des *opcA*-Gens, das für den allosterischen Aktivator OpcA der Glucose-6P-Dehydrogenase (G6PDH) kodiert, sowie die mRNA-Menge des *gnd*-Gens, das für die 6P-Gluconat-Dehydrogenase (decarboxylating) kodiert, in der NtcA-Mutante bereits unter Ammoniumwachstumsbedingungen im Vergleich zum Wt reduziert war (siehe Tab. 6).

Der allosterische Aktivator OpcA und die 6P-Gluconat-Dehydrogenase sind wichtige Elemente des oxidativen Pentose-Phosphat-Weges. Die Hauptfunktion des oxidativen Pentose-Phosphat-Weges ist die Erzeugung von Reduktionsäquivalenten (in Form von NADPH) und Pentosen und Tetrosen für Biosynthesen.

Die mRNA-Menge des *gpml*-Gens, das für eine Phosphoglycerat-Mutase kodiert, die am Glucose-Abbau beteiligt ist, die mRNA-Menge des *bcsA*-Gens (Cellulose Synthase), sowie die mRNA-Menge des *wcaJ*-Gens, das für ein Element der Colansäure-Biosynthese kodiert, war in der NtcA-Mutante gegenüber des Wt in Ammoniummedium erhöht (siehe Tab. 7). Für die Colansäuresynthese wird UDP-Glucose als Ausgangsstoff benötigt.

C) Circadiane Rhythmik

Die mRNA-Menge des Sigmafaktors *rpoD6* (Gruppe 2 σ -Faktor) sowie von *kaiC* und *kaiB* (circadiane Rhythmik) waren in der NtcA-Mutante im Vergleich zum Wt reduziert (siehe Tab. 6).

Wie von Takai *et al.* (2006) berichtet, sind *rpoD6*, *kaiC* und *kaiB* an der circadianen Rhythmik beteiligt, was darauf hindeuten könnte, dass in der NtcA-Mutante eine Störung der circadianen Rhythmik besteht.

3.2.2. NblR-Mutante

Wie bei der NtcA-Mutante wurde auch das Transkriptom der NblR-Mutante unter Standardwachstumsbedingungen mit Ammonium als Stickstoffquelle mit dem Transkriptom des Wildtyps verglichen.

In der NblR-Mutante waren gegenüber dem Wt die Transkripte von 28 Genen erniedrigt und von 10 Genen erhöht (siehe Tab. 6 und 7).

A) Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus

Im Unterschied zur NtcA-Mutante war in der NblR-Mutante die Transkripte der Gene des C/N Status kaum verändert. Lediglich die Gene *gifB* und *ndhF4* waren im Vergleich zum Wt reprimiert. NdhF4 ist an dem speziellen NDH-1MS' Komplex beteiligt (siehe Abb. 24) (Battchikova & Aro, 2007), der in der konstitutiven nieder-affinen CO₂-Aufnahme involviert ist (Maeda *et al.*, 2002; Shibata *et al.*, 2001).

B) Photosyntheseapparat

Überwiegend betrifft die Fehlregulation in der NblR-Mutante die Gene des Photosyntheseapparates, insbesondere des Photosystems I (*psaK1*, *psaK2*, *psaF*, *petJ*). Die Transkripte der Untereinheit Psak (*psaK1* und *psaK2*) des Photosystems I war in der NblR-Mutante im Vergleich zum Wt deutlich niedriger (siehe Tab. 6). In *Arabidopsis* ist die PSI K Untereinheit an der Interaktion zwischen dem Lichtsammelkomplex und dem Reaktionszentrum des PSI beteiligt (Jensen *et al.*, 2000). Die Psak-Mutante bildet mehr PS I, um die verringerte Kapazität der Lichtsammlung zu kompensieren. In *Synechocystis*

konnte gezeigt werden, dass PsaK2 im Hochlicht für den Energietransfer von den Phycobilisomen auf das PSI, sowie für die *state transition* benötigt wird (Fujimori *et al.*, 2005). Mit Hilfe des WATER-PAM Chlorophyll Fluorometers konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die NblR-Mutante im Vergleich zum Wt eine verringerte *state transition* aufweist (siehe Abschnitt C, Abb. 42).

In der NblR-Mutante war das Transkript einer weiteren Untereinheit des PS I, PsaF (*psaF*), sowie das Transkript des *petJ*-Gens, das für das Cytochrom C₅₅₃ codiert, niedriger als im Vergleich zum Wt (siehe Tab. 6). Cytochrom C₅₅₃ ist neben Plastocyanin für den Elektronentransport vom Cytochrom b₆f Komplex zum PS I zuständig.

Die Transkriptmenge von *ctpA*, einer Serin Protease, war in der NblR-Mutante deutlich erhöht gegenüber dem Wt (siehe Tab. 7). Die Protease CtpA ist an der C-terminalen Prozessierung des D1 Proteins beteiligt.

Die C-terminale Prozessierung des D1 Proteins durch CtpA ist unerlässlich für die Integration des wasserspaltenden Komplexes des PS II. Da die D1 Proteinmenge im Wt und der NblR-Mutante ähnlich waren (siehe Abschnitt C, diese Arbeit), deutet die erhöhte Transkriptmenge von *ctpA* auf einen häufigeren Austausch des D1 Proteins in der NblR-Mutante hin.

Die Transkriptmengen von *psbAI*, *psbAII* und *psbAIII*, die für das D1 Protein des PS II kodieren, konnten durch die Mikroarray-Analyse nicht ausgewertet werden, da der p-value in einigen Untersuchungen zu hoch war. Durch Northern Blot Analyse (siehe Abschnitt C, Abb. 56) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Transkriptmenge von *psbAI* und *psbAIII* in der NblR-Mutante im Vergleich zum Wt in stickstoffhaltigem Medium deutlich erhöht war, was zu der erhöhten Expression von *ctpA* passt.

Tabelle 6 Gene, die in der NblR- oder NtcA-Mutante bei Wachstum mit Ammonium im Vergleich zum Wt verringert exprimiert wurden. Als verringert exprimiert wurde gewertet, wenn bei einem p-value ≤ 0,051 der M-value ≤ - 0,75 (Fold change ≤ 0,59). Die verringert exprimierten Gene sind fettgedruckt. *... verstärkt exprimiert - ... nicht auswertbar (p-value zu hoch)

JGI ORF	Gene	Annotated Protein Function	Fold change	
			Growth +N	Growth +N
			Wt vs	Wt vs
			NblR	NtcA
0442	<i>amt1</i>	ammonium transporter	1,09	0,24
2156	<i>glnA</i>	glutamine synthetase, type I	1,00	0,52
2529	<i>gifB</i>	hypothetical protein, similar to sll1515 from Synechocystis PCC 6803 to glutamine synthetase	0,56	2,12*

B - Ergebnisse und Diskussion

Fortsetzung Tabelle 6

JGI ORF	Gene	Annotated Protein Function	Fold change	
			Growth +N Wt vs NblR	Growth +N Wt vs NtcA
		inactivating factor IF17		
0245	<i>gap</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I	0,63	0,23
2333	<i>opcA</i>	Glucose 6-phosphate dehydrogenase, assembly protein	0,84	0,44
0039	<i>gnd</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	1,17	0,40
1656	<i>katG</i>	catalase peroxidase	0,57	0,55
0437	1698	putative glutathione peroxidase	-	0,54
2388	0958	oxalate decarboxylase	0,42	-
0328	1574	possible methyltransferase	0,49	1,01
2602	<i>ctaC</i>	cytochrome c oxidase subunit II	0,67	0,47
2604	<i>ctaE</i>	cytochrome c oxidase subunit III	0,82	0,49
1630	<i>petJ</i>	Apocytochrome c6 precursor (Cyt c553)	0,58	1,06
0407	<i>psaK (1)</i>	Photosystem I reaction center subunit X	0,52	0,88
0920	<i>psaK (2)</i>	Photosystem I reaction center subunit X	0,39	0,82
1250	<i>psaF</i>	Photosystem I reaction centre subunit III (PSI-F)	0,53	0,91
2352	<i>lrtA</i>	light repressed protein A homolog	0,44	0,59
2503	1084	light-dependent protochlorophyllide reductase	0,46	1,13
1216	<i>kaiC</i>	Circadian clock protein KaiC	1,43	0,31
1217	<i>kaiB</i>	Circadian clock protein KaiB	1,31	0,38
2091	<i>ndhF4</i>	NADPH dehydrogenase subunit 5	0,58	0,69
2093	<i>chpY</i>	CO ₂ hydration protein	1,09	0,51
2092	<i>ndhD3</i>	NADPH dehydrogenase subunit 4	1,06	0,55
0569	<i>rpoD4</i>	group2 RNA polymerase sigma factor RpoD4	0,36	0,61
1557	<i>rpoD6</i>	group2 RNA polymerase sigma factor RpoD6	0,73	0,46
1510	<i>sigF1</i>	group3 RNA polymerase sigma factor SigF1	0,53	0,78
1784	<i>sigF2</i>	group3 RNA polymerase sigma factor SigF2	0,77	0,43
0013	1224	unknown protein	0,50	0,51
0129	1344	hypothetical protein	0,78	0,47
0157	1375	unknown protein	0,64	0,33
0215	1441	hypothetical protein	0,47	0,73
0236	1467	unknown protein	0,51	0,93
0316	1559	Orf74-related protein	1,14	0,48
0382	1637	TM2 domain family	0,57	0,72
0391	1649	Protein of unknown function	0,78	0,57
0557	1830	hypothetical protein	1,36	0,49
0797	2106	hypothetical protein	1,60	0,44
0834	2146	Protein of unknown function	0,44	-
0900	2223	hypothetical protein	0,30	12,97*
1506	2889	hypothetical protein	0,87	0,34
1757	0262	hypothetical protein	0,49	0,25
1845	0357	unknown protein	0,37	1,95*
1949	0462	unknown	0,79	0,55

Fortsetzung Tabelle 6

JGI ORF	Gene	Annotated Protein Function	Fold change	
			Growth +N Wt vs	Growth +N Wt vs
			NbIR	NtCA
1979	2951	hypothetical protein	0,32	0,56
2094	0623	Fasciclin domain superfamily	1,09	0,48
2267	0815	hypothetical protein	1,02	0,31
2336	0900	hypothetical protein	1,28	0,16
2486	1066	unknown	0,62	0,59
not annotated	0790	hypothetical protein	0,23	0,07
not annotated	0263	hypothetical protein	0,44	0,29
not annotated	1502	hypothetical protein	0,42	0,48
not annotated	2993	hypothetical protein	-	0,60
not annotated	0463	hypothetical protein	0,85	0,51
not annotated	0403	unknown protein	0,52	1,16
not annotated	1298	hypothetical protein	0,50	0,64
not annotated	2439	hypothetical protein	0,42	-

Tabelle 7 Gene, die in der NbIR- oder NtCA-Mutante bei Wachstum mit Ammonium im Vergleich zum Wt verstärkt exprimiert wurde. Als verstärkt exprimiert wurde gewertet, wenn bei einem p-value $\leq 0,051$ der M-value $\geq + 0,75$ (Fold change $\geq 1,68$). Die verstärkt exprimierten Gene sind fettgedruckt. *... verringert exprimiert
- ... nicht auswertbar (p-value zu hoch)

JGI ORF	Gene	Annotated Protein Function	Fold change	
			Growth +N Wt vs	Growth +N Wt vs
			NbIR	NtCA
2529	<i>gifB</i>	hypothetical protein, similar to sll1515 from Synechocystis sp. PCC 6803 to glutamine synthetase inactivating factor IF17	0,56*	2,12
0469	<i>gpml</i>	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	0,73	1,78
2589	<i>comB</i>	2-phosphosulfolactate phosphatase	1,39	1,88
2026	<i>wcaJ</i>	colanic biosynthesis UDP-glucose lipid carrier transferase	1,14	1,98
0466	<i>bcsA</i>	UDP-glucose-beta-D-glucan glucosyltransferase	0,94	1,99
2330	<i>ctpA</i>	carboxyl-terminal processing protease	1,74	0,77
0915	<i>aroQ</i>	3-dehydroquinate dehydratase, type II	1,83	1,30
1971	<i>ama</i>	N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	2,39	2,78
1094	<i>2442</i>	Transcriptional activator TenA	1,18	1,84
0672	<i>rpoD3</i>	group2 RNA polymerase sigma factor RpoD3	1,73	1,15
1615	<i>rnpA</i>	ribonuclease P protein component	1,90	1,40
0091	1302	Protein of unknown function	2,38	1,12
0092	1303	hypothetical protein	1,08	2,04
0128	1342	hypothetical protein	1,00	2,19
0229	1459	hypothetical protein	1,73	1,30
0444	1704	unnamed protein product	1,85	1,97

B - Ergebnisse und Diskussion

Fortsetzung Tabelle 7

JGI ORF	Gene	Annotated Protein Function	Fold change	
			Growth +N Wt vs	Growth +N Wt vs
			NbIR	NtcA
0528	1797	unknown protein	1,79	1,95
0726	2025	ORF15	1,09	2,15
0900	2223	hypothetical protein	0,30*	12,97
1094	2442	unknown protein	1,18	1,84
1290	2659	metallothionein	0,84	3,51
1632	0120	hypothetical protein	1,28	2,12
1632	2942	hypothetical protein	1,17	1,87
1845	0357	unknown protein	0,37*	1,95
2126	0657	hypothetical protein	1,55	1,95
not annotated	1882	hypothetical protein	1,29	15,06
not annotated	0030	hypothetical protein	2,03	0,99

3.3. Unterschiede im Transkriptom des Wildtyps im Vergleich zur NbIR-, NtcA- und PipX-Mutante unter Stickstoffmangelbedingungen

Die Veränderungen im Transkriptom des Wt sowie der NbIR-, NtcA- und PipX-Mutanten nach 6 h und 24 h Stickstoffmangel wurden durch Mikroarray analysiert (siehe Abb. 23, vertikale Analyse) und die resultierenden Daten zwischen den Stämmen verglichen.

3.3.1. Numerische Übersicht über die Anzahl der regulierten Gene im Transkriptom des Wt, der NbIR-, NtcA- und PipX-Mutante

Die Tabelle 8 zeigt die Anzahl der reprimierten und induzierten Gene des Wildtyps und der NtcA-, NbIR- und PipX-Mutante nach 6 h bzw. 24 h in Stickstoffmangel.

Tabelle 8 Anzahl der regulierten Gene des *S. elongatus* Wildtypes und der NbIR-, NtcA- und PipX-Mutante 6h und 24h nach Stickstoffentzug. (induz. – induziert; repr. – reprimiert) als signifikant induzierte bzw. reprimierte Gene wurden gezählt, deren p-value $\leq 0,051$ und M-value $\geq + 0,75$ bzw. $\leq - 0,75$.

	Wildtyp		NbIR		NtcA		PipX	
	induz.	repr.	induz.	repr.	induz.	repr.	induz.	repr.
6 h –N	204	127	171	122	128	230	150	132
24 h –N	190	133	312	213	318	209	335	223

Bereits 6 h nach Stickstoffentzug war im *S. elongatus* Wt die Transkriptmenge von 204 Genen erhöht und von 127 Genen erniedrigt (siehe Tab. 8). Im Wt war die Anzahl der

induzierten und reprimierten Gene nach 24 h ähnlich der des 6 h Wertes. In allen Mutanten waren 6 h nach Stickstoffentzug im Vergleich zum Wt deutlich weniger Gene induziert, nach 24 h jedoch deutlich mehr. Die Anzahl der reprimierten Gene in der NblR- und PipX-Mutante glich der Anzahl der reprimierten Gene des Wt. In der NtcA-Mutante war nach 6 h Mangel die Transkriptmenge von 230 Genen reprimiert, deutlich mehr als die 127 Gene des Wt (siehe Tab. 8).

Der globale Transkriptionsfaktor NtcA wird für die vollständige Aktivierung der Expression von Genen während Stickstoffmangel in *S. elongatus* benötigt (Flores *et al.*, 1999; Vega-Palas *et al.*, 1992). In der NtcA-Mutante fehlt daher die Aktivierung der Expression wichtiger stickstoffabhängiger Gene. Die geringere Anzahl induzierter Gene im Vergleich zum Wt nach 6 h Ammoniumentzug entspricht daher der Erwartung.

Alle Mutanten zeigten nach 24 h Stickstoffmangel eine erhöhte Anzahl an induzierten und reprimierten Genen als das Wt Transkriptom. Sowohl NblR, als auch NtcA und PipX gehören zu den regulatorischen Proteinen im Differenzierungsprozess, der durch Stickstoffmangel hervorgerufen wird. Eine Mutation in einem Gen, das für die Differenzierung der Zellen während Stickstoffmangel benötigt wird, sollte zu einem erhöhten metabolischen Stress führen. Bei längerer Mangelperiode müsste der metabolische Stress zunehmen und vermehrte sekundäre Reaktionen folgen. Somit könnte es zu einer deutlichen Steigerung der Anzahl an induzierten und reprimierten Genen in der NblR-, NtcA- und PipX-Mutante nach 24 h im Vergleich zu 6 h Stickstoffmangel kommen.

Im Folgenden werden die vergleichenden Transkriptom-Daten des Wt mit der NblR-, NtcA- und PipX-Mutante nach Stoffwechselfunktion gegliedert, beschrieben. Ein besonderes Augenmerk bei der Auswertung der Transkriptome lag auf der Analyse des NtcA-Regulons.

3.3.2. Gene für Proteine des Stickstoff-Stoffwechsels

Cyanobakterien sind in der Lage, verschiedene Stickstoffquellen zu assimilieren. In Ammonium-Mangel-Medium werden die Gene, die an der Aufnahme und Metabolisierung von Stickstoff beteiligt sind, durch NtcA aktiviert (Herrero *et al.*, 2001).

Ammonium ist die bevorzugte Stickstoff-Quelle für Cyanobakterien. *S. elongatus* besitzt zwei Gene, die für Transporter der Ammonium-Aufnahme codieren, *amt1* und *amtB*, wobei *amt1* für den Transporter kodiert und *amtB* für die volle Aktivität des Amt-Kanals erforderlich ist (Paz-Yepes *et al.*, 2007; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002c).

Im Wildtyp war die Menge des *amtB* und *amt1* Transkripts nach Stickstoffentzug erhöht. Das Expressionsmaximum von *amtB* und *amt1* war im Wt nach 6 h Stickstoffmangel erreicht und die Menge an mRNA nahm zum 24 h Zeitpunkt des Stickstoffentzugs hin wieder ab. Im Wt war die Erhöhung des Transkripts des Gens des hochaffinen Transporters *amt1* deutlich stärker als die Zunahme des Transkripts von *amtB* (siehe Tab. 9). In der NtcA-Mutante war dagegen die Induktion der Expression sowohl von *amt1* als auch von *amtB* gehemmt (siehe Tab. 10). Die Gene *amt1* und *amtB* stehen unter der Kontrolle von NtcA und die Sequenzen der Promotoren weisen NtcA-Bindestellen auf (siehe Abb. 27) (Paz-Yepes *et al.*, 2007; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002c).

Nitrat und Nitrit sind an vielen Standorten die häufigsten gebundenen Stickstoffquellen für Cyanobakterien. Die Aufnahme von Nitrat und Nitrit erfolgt durch einen hochaffinen Nitrat/Nitrit-ABC Transporter, der durch die Gene des *nrtABCD* Operons kodiert wird (Frías *et al.*, 1997; Frías *et al.*, 2000; Luque *et al.*, 1994). Die Expression des *nrtABCD* Operons wird im Wt durch NtcA im Stickstoffmangel induziert (Herrero *et al.*, 2001). Die Zunahme der mRNA-Menge von *nrtA*, *nrtB*, *nrtC* und *nrtD* nach Stickstoffentzug konnte durch die durchgeführten Mikroarray-Analysen im Wt bestätigt werden (siehe Tab. 10). In *S. elongatus* befinden sich die Gene für die Nitrat Aufnahme (*nrtABCD*) in einem Operon mit der Nitrit Reduktase *nirA* (Flores *et al.*, 2005). Die Zunahme der mRNA-Menge des *nirA* Genes konnte im Wt nach Stickstoffentzug durch die Mikroarray-Analysen gezeigt werden (siehe Tab. 10). In der NtcA-Mutante hingegen konnte, wie erwartet, keine Zunahme des Transkripts des *nirA-nrtABCD* Operons beobachtet werden.

Im *S. elongatus* Genom befinden sich stromaufwärts und divergent von *nirA* zwei Gene, *nirB* und *ntcB* (siehe Abb. 26), die für die maximale Nitrat Aufnahme benötigt werden. Die Transkription von *nirB-ntcB* wird durch NtcA aktiviert (Aichi & Omata, 1997; Suzuki *et al.*, 1995). In Übereinstimmung mit den Mikroarray-Daten konnte im Wt eine

Zunahme der mRNA-Menge von *nirB* und *ntcB* nach Stickstoffentzug nachgewiesen werden, während in der NtcA-Mutante keine Veränderung des Transkripts von *nirB* und *ntcB* auftrat.

S. elongatus ist in der Lage, Cyanat als alternative Stickstoffquelle zu verwenden (Anderson *et al.*, 1990; Espie *et al.*, 2007). Das Cyanase-Gen (*cynS*) liegt in *S. elongatus* mit den Genen des Cyanat-ABC-Transporters (*cynABD*) in einem Cluster (siehe Abb. 26). Die Expression des Cyanat-Clusters (*cynABDS*) ist abhängig von NtcA (Harano *et al.*, 1997). Eine Zunahme der mRNA-Menge von *cynABDS* konnte im Wt nach Stickstoffentzug durch die Mikroarray-Analyse nachgewiesen werden. In der NtcA-Mutante blieb die Transkriptmenge von *cynABDS* nach Stickstoffentzug unverändert zum Ammoniumwachstum.

Nachdem die Umwandlung der in die Zellen transportierten Stickstoffquellen in Ammonium stattgefunden hat, wird Ammonium über den GS/GOGAT Zyklus assimiliert. Im GS/GOGAT Zyklus ist die Glutamin Synthetase (GS) das Schlüsselenzym zur Bildung von Glutamin. Auch die Expression der Glutamin Synthetase vom Typ I und III (*glnA*, *glnN*) wird durch NtcA aktiviert (Flores *et al.*, 2005; Luque *et al.*, 1994; Reyes & Florencio, 1994; Sauer *et al.*, 2000). In den Mikroarray-Analysen zeigte sich im Wt eine Zunahme der mRNA-Menge von *glnA* und *glnN* im Stickstoffmangel. In der NtcA-Mutante blieb die mRNA-Menge von *glnN* konstant, während die Transkriptmenge von *glnA* sogar reprimiert wurde (siehe Tab. 10).

Das *icd* Gen kodiert für die Isocitrat Dehydrogenase, die α -Ketoglutarat für den GS/GOGAT Zyklus synthetisiert. Die Transkription des *icd* Genes wurde in Wt induziert, aber nicht in der NtcA-Mutante. Bisher wurde nur in *Synechocystis* von einer Aktivierung des *icd* Genes durch NtcA berichtet (Muro-Pastor *et al.*, 1996). Weiterhin konnte durch die Mikroarray-Analysen gezeigt werden, dass die Expression von regulatorischen Genen im Stickstoffmetabolismus wie *glnB* und *ntcB* im Wt induziert werden, jedoch nicht in der NtcA-Mutante.

Die Expression des *gifB* Gens wurde im Wt im Stickstoffmangel (siehe Tab. 10) stark reprimiert, während in der NtcA-Mutante keine Repression zu beobachten war. Bisher wurde nur in *Synechocystis* nachgewiesen, dass die Transkription des Inaktivierungsfaktors IF 17 (*gifB*) der Glutamin Synthetase NtcA-abhängig reguliert ist

(García-Domínguez *et al.*, 2000). Die Mikroarray-Daten deutet jedoch darauf hin, dass *gfbB* in *S. elongatus* wie in *Synechocystis* durch NtcA reprimiert wird.

Die Transkriptmenge einer Cytosin Deaminase (*codA* Gen) war im Wt nach Induktion des Stickstoffmangels erhöht (siehe Tab. 11). Eine Zunahme des Transkripts konnte in der NtcA-Mutante nach Stickstoffentzug in den Mikroarray-Analysen nicht beobachtet werden.

Die Cytosin Deaminase ist an der Pyrimidin-Herstellung beteiligt (Ireton *et al.*, 2002). Bei der Deaminierung von Cytosin entsteht unter Abspaltung von Ammoniak (NH₃) Uracil.

Im unmittelbaren Bereich stromaufwärts des *codA* Genes befindet sich das *rpoD4* Gen (siehe Abb. 28), das zur Gruppe 2 der Sigma Faktor zählt. Auch das *rpoD4* Gen wird nach Stickstoffmangel im Wt induziert, jedoch nicht in der NtcA-Mutante. Die nahe genomische Organisation von *codA* und *rpoD4* mit nur 31 bp Abstand, spricht für ein gemeinsames Transkript. Bei der Untersuchung der Promotorstruktur der Gene wurde ein perfektes NtcA-Bindemotiv mit GTA N₈TAC, 156 bp stromaufwärts des Startcodons des *rpoD4* Gens identifiziert (siehe Abb. 27). Sehr wahrscheinlich ist daher, dass *codA* und *rpoD4* NtcA-abhängig exprimiert werden. In *Synechocystis* konnte für *rpoD2-V* gezeigt werden, dass auch Sigma-Faktoren unter der Kontrolle von NtcA stehen können (Muro-Pastor *et al.*, 2001).

Zusammenfassend zeigte sich, dass in der NtcA-Mutante all die Gene nicht induziert wurden, die für die Aufnahme und Metabolisierung von Stickstoff benötigt werden. Dies könnte zur verminderten Überlebensfähigkeit und Regenerationsfähigkeit der Zellen der NtcA-Mutanten im Stickstoffmangel führen.

Interessanterweise waren die Transkripte aller im Wt induzierten und in der NtcA-Mutante nicht induzierten, dem Stickstoff-Metabolismus zugehörigen Gene in der PipX-Mutante im Vergleich zum Wt deutlich erniedrigt. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von α -Ketoglutarat PipX an NtcA bindet (Espinosa *et al.*, 2006a). Es wird daher vermutet, dass PipX für die volle Aktivierung von NtcA notwendig ist. Eine Rolle von PipX für die Aktivierung NtcA-abhängiger Gene wurde bisher nur für die Gene *glnB*, *glnN* und *nblA* explizit gezeigt (Espinosa *et al.*, 2006a; Espinosa *et al.*, 2007). Die Mikroarray-Daten bestätigen und legen darüber hinaus nahe, dass PipX generell für die

Aktivierung von NtcA notwendig ist, da die Transkriptmenge aller NtcA-abhängig induzierten Gene in der PipX-Mutante im Vergleich zum Wt deutlich verringert war. Auch in der NblR-Mutante waren alle NtcA-abhängig induzierten Gene des Stickstoff-Metabolismus im Vergleich zum Wt verringert exprimiert (siehe Tab. 10). Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass in der NblR-Mutante des Stickstoffmangels nicht wahrgenommen wird. Somit könnte in der NblR-Mutante die geringere Transkription der Gene, die an der Assimilierung von alternativen Stickstoffquellen beteiligt sind, zur verminderten Überlebens- und Regenerationsfähigkeit zumindest im Stickstoffmangel beitragen.

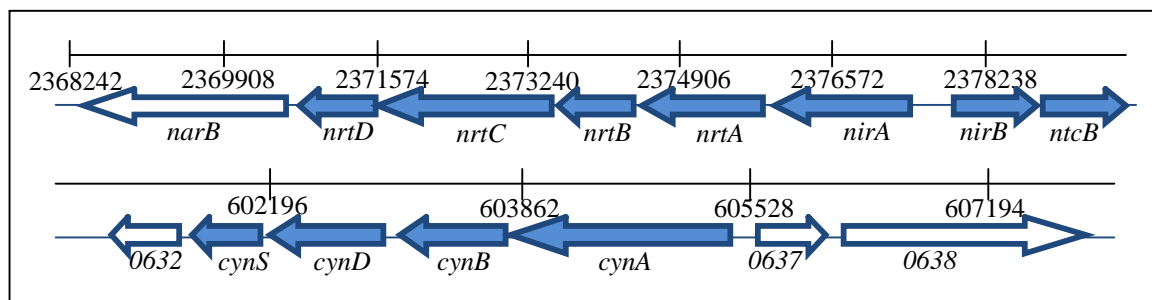


Abbildung 26 Ausschnitt des *S. elongatus* Chromosoms mit den Genen des Cyanase- und *nrtABCD*-Operons, deren Transkription durch Stickstoffmangel induziert wird. Im Wildtyp induzierte Gene sind durch die ausgefüllten Pfeile markiert. Die Pfeilrichtung deutet die Orientierung der Leserichtung an.

<i>amtB</i>	aaaaa	<u>gtag</u> caaaaagt <u>tac</u>	gtatatcaccagctctgccta	gccagagttg	tgagatctccgaqacc
<i>amt1</i>	gaact	<u>gtt</u> acatcgat <u>tac</u>	aaaacaaccttgagctctgc	tgAATGCTta	cagagatctcacaagg
<i>nirA</i>	aagtt	<u>gtag</u> ttttctgt <u>tac</u>	caattgcgaatcgagaactg	ccTAATCTgc	cgagtatgcaagctgc
<i>cynA</i>	gagtt	<u>gta</u> acgacggc <u>tac</u>	atthtgacctgggggttact	acTACCATtc	gcccttaactgaggaa
<i>glnA</i>	tttat	<u>gta</u> tcagctgt <u>tac</u>	aaaagtgcggtttcgggcta	ccTAGGATga	aagcggctcagcaatgc
<i>glnN</i>	gttct	<u>gta</u> tcttttct <u>agc</u>	gatcgagctgggtcaccattg	agTACGATca	attgactagctttttt
<i>glnB</i>	ttgct	<u>gtag</u> cagtaact <u>tac</u>	aactgtggctagtcagcgg	tgtTACCAAa	gagtcgctgaccgggg
<i>ntcA</i>	aaaaa	<u>gtag</u> cagttgct <u>tac</u>	aagcagcagctaggctaggc	cgTACGGTaa	cgagacacttggtcgc
<i>dCoH</i>	attcc	<u>gtag</u> caaaaaag <u>cac</u>	gagattactcgtctcaagtc	gcTACTTTta	aatgcacctcgtgttg
<i>rpoD4</i>	gttta	<u>gtat</u> ccccaaact <u>tac</u>	taaatgcaacaaagactgtc	atcTACTTAA	cagttctttgaagcaa
<i>nsi5</i>	attta	<u>gtag</u> tcaccgt <u>tac</u>	agtcattccttagaacttgt	ttTAGTTAat	tggtagctgtttacac
<i>pilT3</i>	ggcca	<u>gtag</u> tctttcac <u>gac</u>	agtagagcttcattctttcc	tTAGATTgat	agaaacgagaagcgac
2211	gtttc	<u>gta</u> actggata <u>cac</u>	agcttgccoctagagcgggt	gtTAGCGTga	tcccaaaattacgggt
2377	aaaca	<u>gtag</u> ctacagct <u>tac</u>	gaattgaaagctgggtgccag	ccTAGCCTTg	atggttaagcactttc
1044	cgctc	<u>gta</u> aaggcgaa <u>tac</u>	agaagccacaatggacagct	tgctTAGGTTa	aagtcacaactcccaa

Abbildung 27 Ausschnitte der *S. elongatus* Promotorregionen mit putativen NtcA-Bindemotiven. Putative NtcA Bindestellen sind unterstrichen, putative -10 Boxen sind großgeschrieben.

3.3.3. Gene für Proteine des Kohlenstoff-Metabolismus und des Pilus-Apparates

Interessanterweise wurden nach Initiation des Stickstoffmangels auch Gene, die an der Motilität beteiligt sind im Wt induziert (*cheY*, *cheW*, *mcp*, *pilT*) (siehe Tab. 11). In der

NtcA-Mutante konnte durch die Mikroarray-Analyse keine Zunahme der Transkriptmenge von *pilT*, *mcp*, *cheW* und *cheY* nach Stickstoffentzug nachgewiesen werden (siehe Tab. 11). Im Promotorbereich des *pilT* Gens wurde 93 bp stromaufwärts des Startcodons eine nicht-perfekte NtcA-Bindestelle mit der Sequenz GTA N₈ GAC identifiziert (siehe Abb. 27) und die Expression von *pilT* könnte somit NtcA-abhängig sein. Für die Gene *mcp*, *cheW* und *cheY* wurde keine NtcA-Box gefunden. Die Expression von *mcp*, *cheW* und *cheY* scheint daher nicht direkt NtcA-abhängig.

Das Gen *gap* codiert für die Glycerinaldehyd-3P-Dehydrogenase und wird in *S. elongatus* mit der Glykogen Phosphorylase (*glgP*) coexpressiert (Koksharova *et al.*, 2004). Durch die Mikroarray-Daten konnte gezeigt werden, dass die Transkripte der Gene *gap* und *glgP* im Wt bereits nach 6 h Stickstoffentzug induziert wurden (siehe Tab. 11), während in der NtcA-Mutante erst nach 24 h Stickstoffmangel eine Induktion der Gene *gap* und *glgP* beobachtet werden konnte. Die Transkriptmenge von *gap* und *glgP* war in der PipX- und NblR-Mutante ähnlich dem Wt. Im Promotorbereich des *gap* Gens wurde keine potentielle NtcA-Bindestelle gefunden. Die Regulation der Gene *gap* und *glgP* scheint daher nicht direkt NtcA-abhängig zu sein.

Neben der Induktion der Gene des Glykogen-Abbaus wurde auch das Gen des allosterischen Aktivators der Glucose-6P-Dehydrogenase (G6PDH), *opcA* (OpcA) im Wt induziert, nicht jedoch in der NtcA- und NblR-Mutante. Die G6PDH kontrolliert den Kohlenstoffeingang in den oxidativen Pentose-Phosphat-Weg. Sundaram *et al.* (1998) konnte zeigen, dass die Aktivität der G6PDH unter anderem über OpcA reguliert wird.

Die Gene *rbcL* und *rbcS*, die für das Schlüsselenzym des Calvin Zyklus, die Ribulosebisphosphat Carboxylase kodieren, werden in Abwesenheit von Ammonium in *S. elongatus* und *Anabaena* sp. PCC 7120 reprimiert (Aldehni *et al.*, 2003; Ramasubramanian *et al.*, 1994). Mit Hilfe der Mikroarray-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Gene *rbcL* und *rbcS* nach Stickstoffentzug in der NtcA-Mutante schwächer reprimiert wurden als im Vergleich zum Wt (siehe Tab. 13).

Die potentiellen Promotorregionen, der nach Stickstoffentzug im Wt induzierten und in der NtcA-Mutante nicht induzierten Gene, wurden nach putativen NtcA-Bindestellen untersucht. Putative NtcA-Bindestellen wurden auch in noch nicht charakterisierten

Promotorregionen entdeckt (siehe Tab. 11). Auffällig war, dass Konsensus Motive zu NtcA-Bindestellen nur in all jenen Promotorbereichen von Genen entdeckt wurden, deren Transkripte in allen Mutanten (NtcA, NblR und PipX) im Vergleich zum Wt nicht induziert oder deutlich schwächer induziert waren (z.B. *nsi5*, 2377, 1620). Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass in der NblR-Mutante die Signalwahrnehmung des Stickstoffmangels gestört sein könnte, da alle NtcA-abhängig induzierten Gene in der NblR-Mutante nach Stickstoffentzug nicht induziert wurden. Weitere Untersuchungen der bisher noch unbekannten Gene mit NtcA-abhängiger Expression könnten daher auch neue Einblicke in die Stickstoffregulation der NblR-Mutante sowie des *S. elongatus* Wt aufzeigen.

Interessanterweise war die Repression von NtcA-abhängigen Genen in den Mutanten NblR und PipX nicht beeinträchtigt, während die Induktion von NtcA-aktivierten Genen gestört war. Offensichtlich wird PipX nicht für die Repression durch NtcA benötigt.

NblR wird scheinbar nur für die Aktivierung von Genen benötigt, während die Repression von NblR unabhängig scheint.

Su *et al.* (2005) untersuchten durch vergleichende Genomanalysen das NtcA-Regulon in Cyanobakterien. Alle bioinformatisch ermittelten kanonischen NtcA-Bindestellen wurden durch die Transkriptom-Analysen bestätigt. Darüber hinaus konnten durch die Transkriptom-Analysen weitere putative NtcA-Bindestellen mit nicht-kanonischem NtcA-Bindemotiv identifiziert werden, die bioinformatisch nicht ermittelt werden konnten (siehe Tab. 10 – 15, mit * vermerkte NtcA-Bindemotive). Durch die Transkriptom-Daten konnte somit die erste umfassende experimentelle Analyse des gesamten NtcA-Regulons in Cyanobakterien erstellt werden.

3.3.4. Gene für Proteine des Energiestoffwechsels

Die NAD(P)H:Quinone Oxidoreduktase (NDH-1) Komplexe der Cyanobakterien besitzen einen gemeinsamen NDH-1M Kern-Komplex und unterscheiden sich in der Zusammensetzung den distalen Membran-Domänen, bestehend aus den NdhD und NdhF Proteinen (siehe Abb. 24) (Battchikova & Aro, 2007; Ogawa & Mi, 2007). Der große

NDH-1L Komplex besteht aus dem Kern-Komplex und den Komponenten NdhF1/NdhD1 und ist an der Respiration und dem zyklischen Elektronentransport um PS I beteiligt (Battchikova & Aro, 2007).

Durch die Mikroarray-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Gene der NDH-1 Komplexe während der Stickstoffchlorose im Wt nicht reguliert wurden (siehe Tab. 14). In der NtcA-Mutante hingegen konnte eine sehr starke Repression der Gene der NDH-1M Untereinheiten *ndhA*, *ndhI*, *ndhG*, *ndhE* und *ndhB* bereits nach 6 h Stickstoffmangel nachgewiesen werden (siehe Tab. 14). In der NblR- sowie PipX-Mutante trat die Repression der Gene *ndhA*, *ndhI*, *ndhG*, *ndhE* und *ndhB* erst nach 24 h Stickstoffmangel auf (siehe Tab. 14). Neben den Genen des NDH-1M Kern-Komplexes (*ndhA*, *ndhI*, *ndhG*, *ndhE*, *ndhB*) war auch der distale Komplex NdhF1 (*ndhF1*) in der NtcA-Mutante bereits nach 6 h und in der NblR- und PipX-Mutante nach 24 h Stickstoffmangel stark reprimiert (siehe Tab. 14).

In der NtcA-Mutante wurden auch die Gene der Kernproteine des PS I (*psaA*, *psaB*) und die Gene *psaC*, *psaD* und *psaE* der PS I Untereinheiten, die am zyklischen Elektronentransport beteiligt sind, im Stickstoffmangel stark reprimiert (siehe Tab. 15). Wie die Gene des NDH-1 Komplexes wurden auch die Gene des PS I (*psaA*, *B*, *C*, *D*, *E*) in der NblR- und PipX-Mutante erst nach 24 h Stickstoffmangel stark reprimiert, während diese Gene im Wt nicht reguliert wurden. Im Wt wurde nur die mRNA-Menge von *psaF*, *psaI*, *psaJ* und *psaL* wie in der NtcA-, NblR- sowie in der PipX-Mutante reprimiert.

In der NtcA-Mutante nach 6 h und in der NblR- und PipX-Mutante nach 24 h Stickstoffmangel wurde die Transkripte von Genen des PS II (*psbA*, *B*, *E*, *H*, *L*, *O*, *T*, *V*) sowie Komponenten des Cytochrom *b₆f* Komplexes (*petM*) stark reprimiert. Auch die Elemente des Elektronentransportes Plastocyanin (*petE*) und Cyt_c₅₅₃ (*petJ*) wurden in der NtcA-Mutante bereits 6 h nach Stickstoffentzug stark reprimiert. In der NblR- und PipX-Mutante wurden diese Gene wiederum erst nach 24 h reprimiert, während im Wt nur eine transiente Repression stattfand.

Die ATP Synthase wird in einem *atp1* Cluster aus 7 Genen und einem zweiten *atp2* Cluster aus 2 Genen transkribiert (Cozens & Walker, 1987). Die Abfolge der Gene in *S. elongatus* gleicht dem von *Anabaena* sp. PCC 7120 (McCarn *et al.*, 1988). Unmittelbar

stromaufwärts des *atp1* Clusters befindet sich ein weiteres Gen (1574) (siehe Abb. 28), das zusammen mit der gesamten ATP-Operon als ein 7 kb große polycistronische mRNA transkribiert wird (McCarn *et al.*, 1988).

Durch die Mikroarray-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Gene der ATP Synthase (*atp1*, *atpB*, *E*, *G*, *F*, *H*, *A*, *G*, *D*, *C*) im Wt nach Initiation des Stickstoffmangels reprimiert wurden (siehe Tab. 14). In der NtcA-, NblR- und PipX-Mutante konnte eine Hyperrepression dieser Gene nach Stickstoffentzug im Vergleich zum Wt beobachtet werden.

Wellen (2008) konnte zeigen, dass in der NblR-Mutante die Menge an ATP nach 24 h Stickstoffmangel drastisch absinkt. Die NtcA- und NblR-Mutante sind nach Entzug der Stickstoffquelle nicht mehr in der Lage, nach Stickstoffzugabe zu regenerieren (diese Arbeit, Sauer *et al.*, 1999; Sauer *et al.*, 2001; Schwarz & Grossman, 1998). Der starke Zusammenbruch der Elektronentransportkette (siehe oben) bis hin zur ATP-Generation, könnte in der NblR- und NtcA-Mutante zum Verlust von NADH und ATP führen. Dieser Verlust an bereitstehender Energie könnte die Regeneration der NtcA- und NblR-Mutante nach längerem Stickstoffentzug verhindern.

Während der ersten Phase der Chlorose werden die Phycobilisomen abgebaut. Die Transkripte der Gene des Allophycocyanins (*apcA*, *apcB*, *apcI*, *apcE*), sowie des Phycocyanins wurden im Wt nach Stickstoffentzug reprimiert (siehe Tab. 15). In der NtcA-Mutante wurden die Gene für die Proteine des Allophycocyanins (*apcA*, *apcB*, *apcI*, *apcE*) und des Phycocyanins (*cpcA*, *cpcB*, *cpcI*) im Vergleich zum Wt hyperreprimiert. Interessanterweise wurden die Gene des Allophycocyanins (*apc*) sowie der Linker-Proteine in der NblR-Mutante wie im Wt reprimiert (siehe Tab. 15). Eine Repression der Phycocyanin (*cpc*) Gene trat in der NblR-Mutante erst nach 24 h Stickstoffentzug auf.

Schwarz und Grossmann (1998) konnten nachweisen, dass der Abbau der Phycobilisomen in der NblR-Mutante beeinträchtigt ist. Die Synthese von Phycobilisomenproteinen nach Stickstoffentzug in der Mutante konnte durch S³⁵-Markierung beobachtet werden (siehe Abschnitt C, diese Arbeit). Somit scheint nicht nur der Abbau der Phycobilisomen, sondern auch die Inhibition der Transkription von *cpc* in der NblR-Mutante zumindest vorübergehend beeinträchtigt.

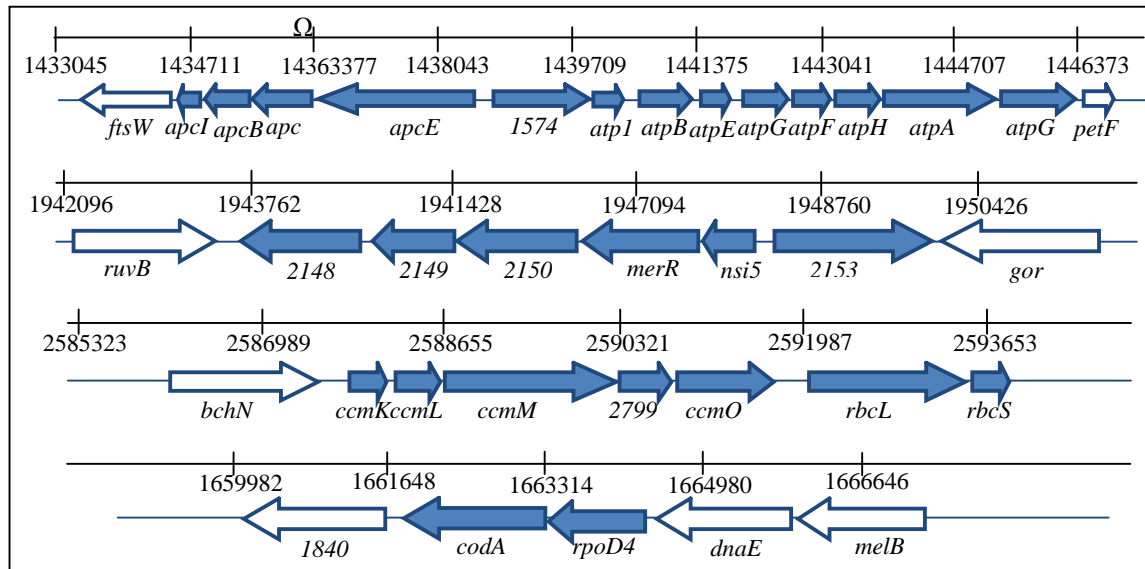


Abbildung 28 Ausschnitt des *S. elongatus* Chromosoms, deren Transkription auf den Stickstoffmangel reagieren. Im Wildtyp induzierte Gene sind durch die ausgefüllten Pfeile mit Orientierung der Leserichtung markiert.

3.4. Transkriptom-Analyse der NtcA-Mutante im Vergleich zum Wt und der NblR-Mutante im Vergleich zum Wt

Wie in Absatz 3.3 ausgeführt, wurden in den Mikroarray-Analysen jeweils das Transkriptom des Wt unter Ammoniumbedingungen mit dem Transkriptom des Wt nach 6 h und 24 h Stickstoffmangel experimentell verglichen (siehe Abb. 23, vertikale Analysen). Anschließend wurden die resultierenden Daten des Wt mit den Daten der entsprechend behandelten NblR-, NtcA- und PipX-Mutanten verglichen.

Um die Mikroarray-Analysen durch weitere Daten abzusichern, wurde zusätzlich das Transkriptom des Wt experimentell direkt mit dem Transkriptom der NblR- bzw. NtcA-Mutante verglichen (siehe Abb. 23, horizontale Analysen). Dabei kann jedoch keine Aussage über reprimierte oder induzierte Gene gemacht werden. Es ist lediglich eine Aussage über die Transkriptmenge im Verhältnis zum Wt möglich.

Wie in den vertikalen Analysen wurde der Schwellenwert des M-Wertes, der eine Auswahl der signifikanten Veränderungen erlaubt, auf $\geq 0,75$ und $\leq -0,75$ festgelegt.

Wie zu erwarten, stieg die Anzahl an fehlregulierten Gene nach Induktion des Stickstoffmangels sowohl in der NblR-Mutante als auch in der NtcA-Mutante an (siehe Tab. 9). Nach 6 h Stickstoffmangel waren in der NblR-Mutante im Vergleich zum Wt 81 Gene signifikant stärker und 67 Gene schwächer exprimiert. Die Anzahl fehlregulierter Gene nach Stickstoffentzug war in der NtcA-Mutante im Vergleich zur NblR-Mutante

deutlich größer. Nach 6 h Stickstoffmangel waren in der NtcA-Mutante im Vergleich zum Wt 158 Gene signifikant stärker und 233 schwächer exprimiert.

Die fehlregulierten Gene der horizontalen Analyse bestätigten die Ergebnisse der vertikalen Analyse (siehe CD im Anhang).

Tabelle 9 Anzahl der fehlregulierten Gene der NblR-Mutante (R) und der NtcA-Mutante (A) im Vergleich zum Wildtyp bei Wachstum mit Ammonium sowie nach 6 h Stickstoffentzug (horizontale Analyse s. Abb. 23). signifikant schwächer bzw. stärker exprimierte Gene wurden als fehlreguliert bewertet, wenn der p-value $\leq 0,051$ und M-value $\geq + 0,75$ bzw. $\leq - 0,75$

	NblR-Mutante		NtcA-Mutante	
	mehr Transkript als Wt	weniger Transkript als Wt	mehr Transkript als Wt	weniger Transkript als Wt
horizontale Analyse:				
+ N	10	28	21	35
6 h -N	81	67	158	233

3.5. Analyse der Gene der im *S. elongatus* Wt am höchsten induzierten Gene im Stickstoffmangel

Um die Mikroarray-Daten durch weitere unabhängige Methoden abzusichern, wurden Northern-Blot Analysen und semiquantitative RT-PCRs durchgeführt (siehe Abschnitt C, 3.6.). Als repräsentatives Beispiel wurden hierfür die Gene *cpcB* und *nsi5* untersucht. Sowohl in den Mikroarray-Daten als auch in den Northern-Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass *cpcB*, das für Phycocyanin kodiert, im Wt nach Stickstoffentzug reprimiert wird (vergl. Tab. 15 und Abb. 56).

In den Mikroarray-Analysen gehörte *nsi5* zu den im Wt am stärksten induzierten Genen nach Stickstoffentzug, während das Gen in allen Mutanten (NblR, NtcA, PipX) deutlich schwächer induziert wurde (siehe Tab. 12).

Die Northern-Blot Analysen und die semiquantitativen RT-PCRs bestätigten die starke Zunahme des *nsi5* Transkripts im Wt nach Stickstoffentzug, sowie das im Vergleich zum Wt deutlich geringere Transkript in der NblR-Mutante (siehe Abschnitt C, Abb. 56 & 57). Durch 2D-Proteingelanalysen konnte das Nsi5-Protein bereits als spezifisch im Stickstoffmangel induzierter Nsi5-Spot (nitrogen starvation induced) in *S. elongatus* charakterisiert werden (Aldehni *et al.*, 2003).

3.5.1. Nachweis eines polycistronischen Transkripts der Gene *nsi5*, *merR*, *2150*, *2149* und *2148*

Stromabwärts des *nsi5* Gens befinden sich vier weitere Gene, mit den Bezeichnungen *merR*, *2150*, *2149* und *2148* (siehe Abb. 30), die in den Mikroarray-Analysen ähnliche Transkriptmengen wie *nsi5* aufwiesen (siehe Tab. 12). Die Analyse der genomischen Organisation der fünf Gene (*nsi5*, *merR*, *2150*, *2149*, *2148*) zeigte, dass zwischen dem Stoppcodon eines Gens zum Startcodon des jeweils nachfolgenden Gens nur maximal 58 bp lagen. Daher wurde vermutet, dass diese fünf Gene ein Operon bilden könnten. Durch RT-PCR wurde überprüft, ob ein polycistronisches Transkript über die Gene *nsi5* bis *2148* (ca. 4300 bp) existiert. Die Primerpaare über die gesamten fünf Gene wurden so gewählt, dass sich die einzelnen, bei der RT-PCR entstehenden Fragmente (A-D) um jeweils ca. 700 bp überschneiden (siehe Abb. 22).

In den Mikroarray-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Transkripte der Gene *nsi5*, *merR*, *2150*, *2149* und *2148* nach Stickstoffentzug im Wt deutlich zunahm (siehe Tab. 12). Daher wurde als Template für die RT-PCR RNA von Wt Zellen nach 6 h Stickstoffmangel verwendet.

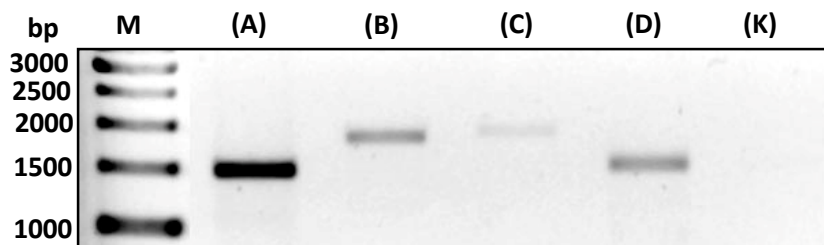


Abbildung 29 Fragmente der RT-PCR für den Nachweis einer Operonstruktur der Gene *nsi5*, *merR*, *2150*, *2149*, *2148*. (A) – (D) entsprechen den Fragmenten (A) – (D) aus Abbildung 24. (K) Kontroll-PCR mit Primerpaar (A) ohne Reverse Transkriptase. Verwendete Primerpaare siehe Abschnitt B, Material und Methoden. Als *Template* wurde 60 ng RNA von Wt Zellen nach 6h Stickstoffmangel verwendet.

Für alle vier Fragmente (A), (B), (C) und (D) (siehe Abb. 22) konnten durch RT-PCR Produkte nachgewiesen werden (siehe Abb. 29). Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass die Gene *nsi5*, *merR*, *2150*, *2149* und *2148* als eine polycistronische mRNA transkribiert werden. Die Gene *nsi5*, *merR*, *2150*, *2149* und *2148* wurden als Nsi5-Operon bezeichnet.

3.5.2. Sequenzvergleiche

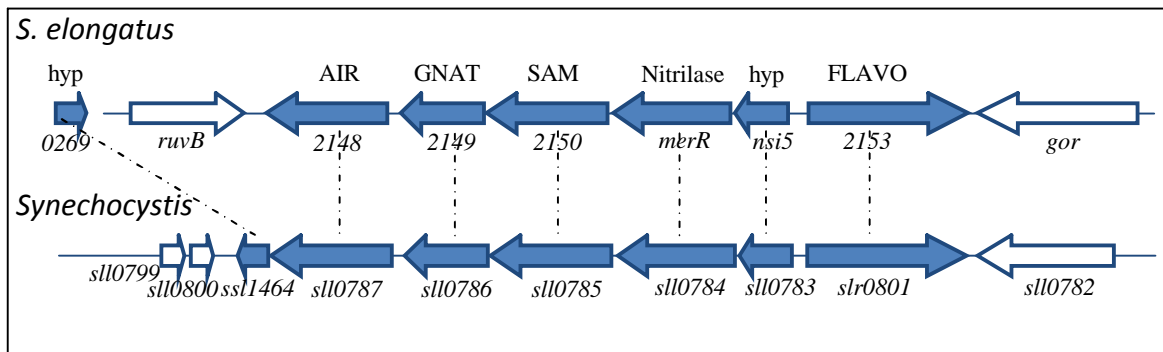


Abbildung 30 Organisation des Nitrilase Gen-Clusters aus *S. elongatus* und *Synechocystis*. Die hochkonservierten Gene sind gefüllte Pfeile. Die Pfeilrichtung deutet die Orientierung der Leserichtung an.

Bei dem Sequenzvergleich der Gene *nsi5*, *merR*, *2150*, *2149* und *2148* mit der Proteinsequenzdatenbank zeigte die Aminosäuresequenz des ersten Gens *nsi5* in dieser Struktur nur sehr schwache Homologien (26% Identity) zu hypothetischen Proteinen der DsrE Familie der methanogenen Archaeen (*Methanococcus*). Die Proteine der DsrE Familie sind an der intrazellulären Schwefelreduktion beteiligt. Das zweite Gen *merR* kodiert für eine aliphatische Nitrilase, die Kohlenstoff/Stickstoffbindung hydrolysieren kann. Die aliphatische Nitrilase (*merR* Gen) aus *S. elongatus* besitzt große Homologien (63,8 % Identity) zur *Synechocystis* Nitrilase, deren Aktivität nachgewiesen werden konnte (Heinemann *et al.*, 2003). Das dritte Gen *2150* in diesem möglichen Operon zeigt Homologien zu Biotin-Synthase Enzymen, Radikal SAM Methyltransferasen, die durch konservierte CxxxCxxC Sequenz-Motive (C, Cys; x, beliebige Aminosäure) charakterisiert sind (Berkovitch *et al.*, 2004). Das Gen *2149* zeigt Homologien zu N-Acetyltransferasen (NAT), die zur GNAT Superfamilie gehören (Sterner & Berger, 2000). Die Enzyme der GNAT Superfamilie übertragen die Acetylgruppe von einem Donor (meist Acetyl-Coenzym A) auf die Amino-Gruppe von Proteinen (Westwood & Sim, 2007). NAT können an der Genregulation und Detoxifikation von Antibiotika beteiligt sein (Georgakopoulos & Thireos, 1992; Podar *et al.*, 2005; Wittschieben *et al.*, 1999). Das Gen *2148* weist Ähnlichkeiten zur 5'-Phosphoribosyl-5-aminoimidazole Synthase-verwandten Proteinsuperfamilie (AIRS) auf, deren Vertreter an der Purin-Biosynthese, sowie Selenophosphatsynthese beteiligt sind. Beim AIRS Enzym werden unter ATP-Verbrauch durch die Ligase Aktivität C-N-Bindungen mit Glutamin als Amido-N-Donor geknüpft (Schendel *et al.*, 1989). Am Beginn dieses Clusters aus fünf Genen, auf dem

entgegengesetzten Strang, befindet sich ein Gen mit Homologie zu einem Flavoprotein, das am K^+ -Transport beteiligt sein könnte. Durch Sequenzvergleiche der Nitrilase Genfamilie konnte gezeigt werden, dass dieses gesamte Cluster innerhalb der Bakterien weit verbreitet ist (Podar *et al.*, 2005). In *Synechococcus* sp. WH 8102, *Synechocystis* und einigen Proteobakterien (β - und γ -Gruppe) besteht dieses Cluster aus sieben Genen in gleicher Reihenfolge (siehe Abb. 30). Das siebte Gen (0269) in *S. elongatus* befindet sich an einer anderen Stelle im Genom, unterlag aber in den Mikroarray-Analysen dem gleichen Regulationsmuster, wie die anderen Gene des Clusters (siehe Tab. 12). Die hohe Konservierung dieser Clusters über eine größere taxonomische Distanz spricht auch für eine funktionelle Konservierung der Genprodukte.

3.5.3. Nachweis der Bindung von NtcA an den *nsi5*-Promotorbereich

Im Promotorbereich des Gens *nsi5* befinden sich mehrere putative NtcA-Bindemotive (siehe Abb. 27 & 63). Das DNA-Fragment der *nsi5*-Promotorregion (*F-nsi5*) wurde auf eine Fließzelle (FC 2) des SA-Sensorchips eines Biacore-Gerätes geladen (siehe Abschnitt A, Material und Methoden). Anschließend wurden Bindungsstudien mit unterschiedlichen Mengen NtcA und α -Ketoglutarat an das DNA-Fragment durchgeführt (siehe Abb. 31).

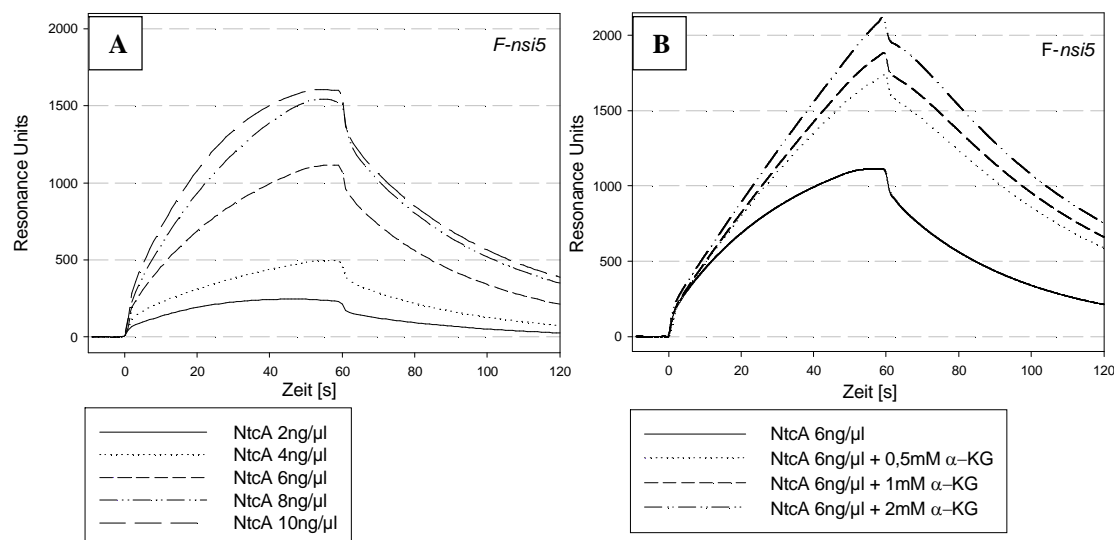


Abbildung 31 Bindungs- und Dissoziations-SPR von verschiedenen Konzentrationen von NtcA und unter dem Einfluss von α -Ketoglutarat (α -KG) an das DNA-Fragment der *nsi5*-Promotorregion (*F-nsi5*). (A) Für das Experiment wurden verschiedene Mengen an NtcA (2-10 ng/μl) für 1 min bei einer Flussrate von 15 μl/min injiziert. (B) Jeweils 6 ng/μl NtcA wurden vor der Injektion für 5 min auf Eis ohne oder mit 0,5 mM, 1 mM, 2 mM α -KG inkubiert. Die Experimente wurden dreimal wiederholt. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives Ergebnis.

Durch SPR-Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass NtcA an *F-nsi5* binden kann (siehe Abb. 31). Mit steigender NtcA-Konzentration erhöhte sich auch die Menge an gebundenem NtcA an *F-nsi5* (siehe Abb. 31A, steigende Resonance Units). Durch Zugabe von α -Ketoglutarat konnte die Affinität von NtcA an *F-nsi5* noch deutlich gesteigert werden (siehe Abb. 31B). Diese stark positive Wirkung von α -Ketoglutarat auf die Bindung von NtcA an dieses Fragment ähnelt dem Verhalten des *glnB*-Promotorfragments (vergl. Abschnitt A, diese Arbeit). Die Bindung von NtcA an *F-nsi5* wurde ebenfalls durch Gel-Retardierung bewiesen (siehe Abschnitt C, Abb. 64). Somit konnte die Bindung von NtcA an einer bisher noch nicht charakterisierten Promotorregion bestätigt werden und *nsi5* als ein weiteres NtcA-abhängiges Gen beschrieben werden.

3.5.4. Inaktivierung der Gene *nsi5*, *merR*, *2150*, *2149* und *2148*

Für die Untersuchung der Funktion der Gene *nsi5*, *merR*, *2150*, *2149* und *2148* wurden durch den Einbau einer Kanamycinresistenz-Kassette Deletionsmutanten, wie in Abschnitt C Material und Methoden beschrieben, erzeugt. Hierbei wurden die Gene vollständig durch eine Kanamycinresistenz-Kassette, die in gleicher Leserichtung der Gene inseriert wurde, ersetzt (siehe Abb. 32). In einer weiteren Mutante (Nsi5-Operon-Mutante) wurde eine Kanamycin-Kassette mit starkem Terminator, entgegen der Leserichtung im *nsi5*-Gen integriert. Die Segregation der Mutanten wurde durch PCR überprüft.

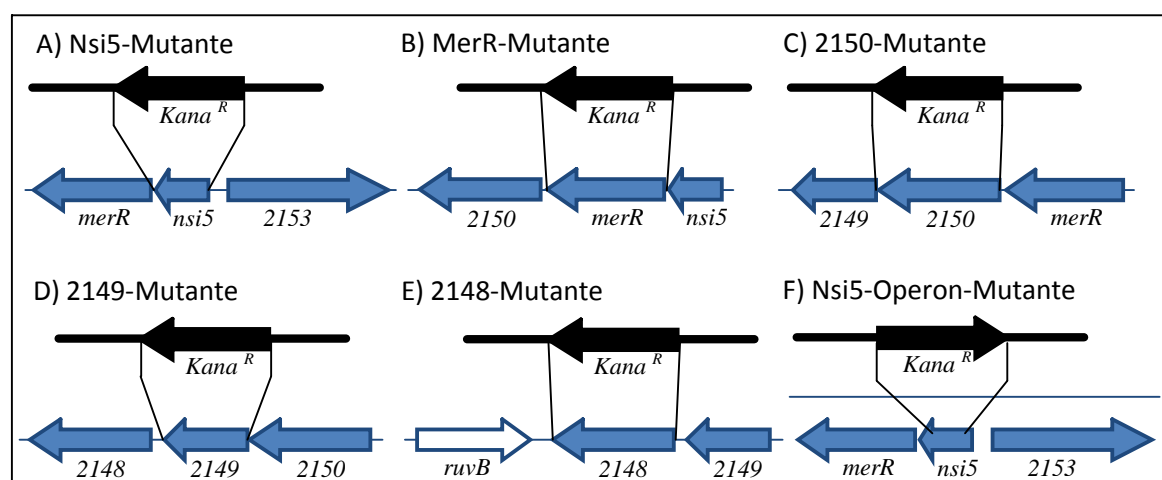


Abbildung 32 Schema zur Mutantenkonstruktion. Die Pfeilrichtung deutet die Orientierung der Leserichtung an. Die inaktivierten Gene *nsi5*, *merR*, *2150*, *2149* und *2148* wurden vollständig durch eine Kanamycin-Kassette (*Kana^R*) ersetzt.

Da die Gene *nsi5*, *merR*, *2150*, *2149* und *2148* als polycistronische mRNA transkribiert werden (siehe B.3.5.1.), wurde durch RT-PCR überprüft, ob trotz Inaktivierung eines Gens die jeweils anderen Gene des Operons noch transkribiert werden (siehe Abb. 33). Die Primerpaare wurden so gewählt, dass die bei der RT-PCR entstehenden Fragmente (A - F) die Gene *upstream* und *downstream* des inaktivierten Gens überprüften (siehe Abb. 22). So wurde z.B. in der Nsi5-Mutante getestet, ob die Transkription der Gene *merR*, *2149* und *2148* stattfand. Als Template für die RT-PCR wurde RNA von *S. elongatus* Zellen nach 6 h Stickstoffmangel verwendet.

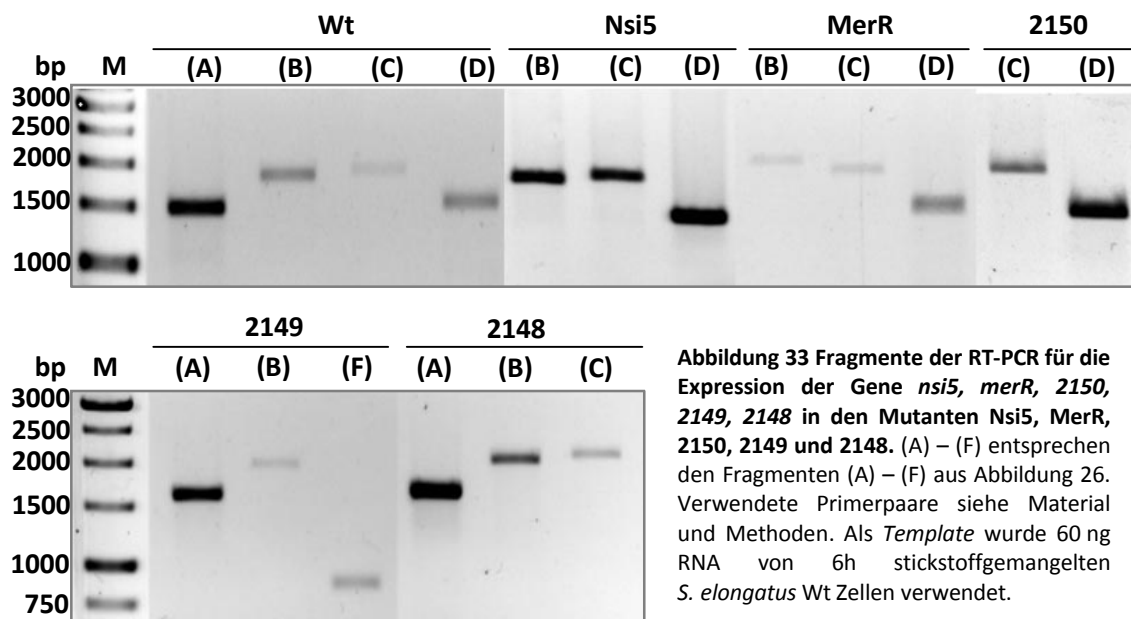


Abbildung 33 Fragmente der RT-PCR für die Expression der Gene *nsi5*, *merR*, *2150*, *2149*, *2148* in den Mutanten Nsi5, MerR, 2150, 2149 und 2148. (A) – (F) entsprechen den Fragmenten (A) – (F) aus Abbildung 26. Verwendete Primerpaare siehe Material und Methoden. Als *Template* wurde 60 ng RNA von 6h stickstoffgemangelten *S. elongatus* Wt Zellen verwendet.

Für die Mutanten Nsi5, MerR, 2150, 2149 und 2148 konnten sowohl für den *upstream* als auch für den *downstream* Bereich des durch eine Kanamycin-Kassette ersetzte Gen Produkte nachgewiesen werden (siehe Abb. 33). Die Transkription der Gene des Nsi5-Operons konnte durch die RT-PCR nachgewiesen werden. Trotz Knockout eines Gens des Nsi5-Operons fand die Transkription der weiteren Gene des Operons statt.

3.5.5. Physiologische Untersuchung der Mutanten des *nsi5* Operons

Um die Auswirkung der Mutationen im *nsi5*-Operon auf den Chloroseverlauf zu charakterisieren, wurden die Mutanten Nsi5, MerR, 2150, 2149 und 2148 auf Stickstoffmangel gesetzt und Ganz-Zell-Spektren im Zeitverlauf der Chlorose erstellt (siehe Abb. 34).

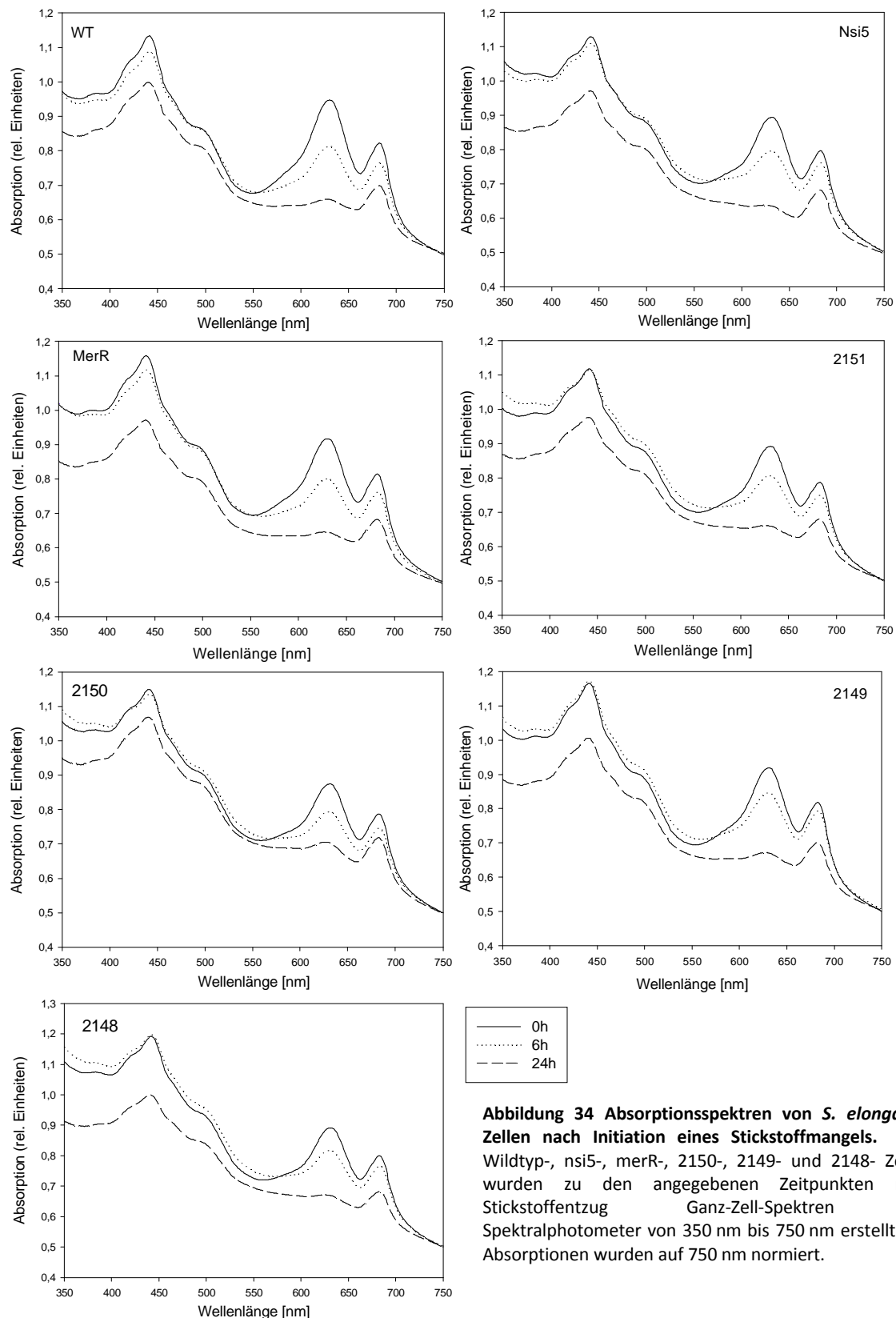


Abbildung 34 Absorptionsspektren von *S. elongatus*-Zellen nach Initiation eines Stickstoffmangels. Von Wildtyp-, *nsi5*-, *merR*-, 2150-, 2149- und 2148- Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Stickstoffentzug Ganz-Zell-Spektren im Spektralphotometer von 350 nm bis 750 nm erstellt. Die Absorptionen wurden auf 750 nm normiert.

Durch Ganz-Zell-Spektren kann die Pigmentzusammensetzung im Verlauf der Stickstoff-Chlorose verfolgt werden (siehe Abb. 34). Die Spektren von Wt, *Nsi5*-, *MerR*-, 2150-, 2149- und 2148-Mutante zeigten die typischen Absorptionsmaxima von Chlorophyll a

bei 440 nm und 680 nm, ein Maximum der Carotinoide bei 500 nm, sowie der akzessorischen Pigmente von Phycocyanin und Allophycocyanin bei 630 nm. Die Wt-Zellen sowie die Zellen aller Mutanten (nsi5, merR, 2150, 2149, 2148) zeigten eine graduelle Abnahme der Chlorophyll a und Phycobilisomen Absorption im Verlauf der Stickstoff-Chlorose (siehe Abb. 34). Die Spektren zeigten deutlich, dass die Reduktion der Pigmente während des Chloroseprozesses in den Mutanten wie im Wt verlief.

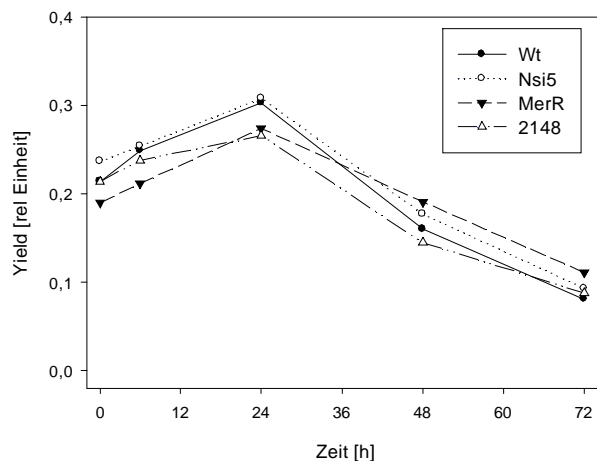


Abbildung 35 Quantenausbeute (Yield) von *S. elongatus* Wt Zellen und Nsi5-, MerR- und 2148-Mutante während der Stickstoff-Chlorose gemessen mit Hilfe des WATER-PAM Chlorophyll Fluorometers aus der maximalen Fluoreszenzausbeute (F_m') mit einem Sättigungspuls einer vorher bei $498 \mu\text{mol Photonen m}^{-1} \text{s}^{-1}$ belichteten Probe. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis.

In *S. elongatus* Zellen wird während der Chlorose die PS II Aktivität auf ein Minimum abgesenkt. Der Erhalt der photosynthetischen Restaktivität ist für den Erhalt der Lebensfähigkeit essentiell (Görl *et al.*, 1998, Sauer *et al.*, 2001). Die PS II Aktivität kann mit Hilfe des WATER-PAM Chlorophyll Fluorometers durch Gabe von Sättigungspulsen bestimmt werden (siehe Abschnitt C, Material und Methoden). Die effektive Quantenausbeute der photochemischen Energieumwandlung (Yield) wird aus dem Quotienten der variablen Fluoreszenz und der maximalen Fluoreszenz bestimmt. Der Yield ist somit ein Maß für die Effizienz mit der die Anregungsenergie auf die offenen Reaktionszentren des PS II weitergeleitet werden.

Im Wt sowie in allen Mutanten (Nsi5, MerR, 2150, 2149, 2148) wurden gleiche Yield Werte während der Stickstoff-Chlorose beobachtet (siehe Abb. 35, nur der Kurvenverlauf von Wt, Nsi5, MerR und 2148 gezeigt). In den ersten Stunden der Stickstoff-Chlorose stieg der Yield an und fiel dann auf einen geringen Wert ab.

Auch in der Nsi5-Operon-Mutante verlief der Abbau des Chlorophyll a und der Phycobilisomen sowie die Reduktion der PS II Aktivität wie im Wt (Abb. nicht gezeigt).

Die starke Zunahme der Transkripte (*nsi5*, *merR*, 2150, 2149, 2148) nach Stickstoffentzug im Wt deutet auf eine wichtige Rolle des gesamten Clusters im Verlauf der Stickstoffchlorose hin. Nach Inaktivierung der einzelnen Gene zeigte jedoch keine der Mutanten (Nsi5, MerR, 2150, 2149, 2148) Auffälligkeiten im Abbau der Phycobilisomen oder in der Anpassung der PS II Aktivität während der Stickstoffchlorose. Möglicherweise sind die Genprodukte nicht an der Anpassung des Photosyntheseapparates im Stickstoffmangel beteiligt. Da das gesamte Cluster aus sieben Genen (siehe oben) über eine größere taxonomische Distanz konserviert ist, deutet dies auf eine funktionelle Konservierung der Genprodukte hin. Aufgrund von Sequenzhomologien wäre denkbar, dass die Genprodukte an der Entgiftung von Antibiotika und Nitrilen beteiligt sind, die durch andere Mikroorganismen und Pflanzen gebildet werden.

4. Zusammenfassung NtcA und PipX-Mutante

Durch die Transkriptom-Daten konnte die erste experimentelle Analyse des gesamten NtcA-Regulons in Cyanobakterien erstellt werden. Die durch bioinformatische-Analysen ermittelten NtcA-Bindestellen von Su *et al.* (2005) konnten durch die Mikroarray-Analysen bestätigt werden. Neben diesen bereits bekannten perfekten NtcA-Bindemotiven konnten durch die Transkriptom-Analyse zusätzlich 20 weitere imperfekte NtcA-Bindemotive identifiziert werden (siehe Tab. 10 - 15).

Der Vergleich des Transkriptoms des *S. elongatus* Wildtyps mit dem Transkriptom der NtcA-Mutante zeigte bereits Unterschiede zwischen dem Transkriptom des Wt und der NtcA-Mutante in Ammoniummedium. Sowohl unter Ammoniumbedingungen, als auch im Stickstoffmangel waren Gene in der NtcA-Mutante fehlreguliert, die für Proteine des Stickstoff- und Kohlenstoff-Stoffwechsels kodieren. Die Transkriptmenge des *gifB* Gens war in der NtcA-Mutante in Ammoniumbedingung deutlich höher als im Wt, was darauf hindeutet, dass im Wt selbst bei Ammoniumbedingung *gifB* durch NtcA reprimiert wird. Des Weiteren war unter Ammoniumbedingungen die mRNA-Menge der Gene die für Proteine des NDH-1MS Komplexes, der hochaffinen CO₂-Aufnahme kodieren im Vergleich zum Wt deutlich verringert, was durch eine veränderte C/N Balance aufgrund verringerter Ammonium-Assimilation hervorgerufen werden könnte.

Im Stickstoffmangel wurden in der NtcA-Mutante all die Gene nicht induziert, die für die Aufnahme und Metabolisierung von Stickstoff benötigt werden.

Durch die Mikroarray-Analyse und durch den Vergleich der Transkriptmenge der Gene in der NtcA-, NblR- und PipX-Mutante mit der Transkriptmenge im Wt konnten neue, noch nicht als NtcA-abhängig beschriebene Gene als möglicherweise NtcA-abhängig identifiziert werden. Auffällig war, dass NtcA-Bindemotive nur in all jenen Promotorbereichen von Genen entdeckt wurden, deren Transkripte in allen Mutanten (NtcA, NblR und PipX) im Vergleich zum Wt nicht induziert oder deutlich schwächer induziert waren. Putative NtcA-Bindestellen mit GTA N₈ TAC konnte im Promotorbereich von *pilT3* (*twitching mobility protein*), *rpoD4-codA* (Sigma Faktor Gruppe 2, Cytosin Deaminase), *mocD* (Hydrocarbon Oxygenase) identifiziert werden, sowie für *nsi5-merR-2150-2149-2148* (Nsi5-Operon, siehe oben) funktionell nachgewiesen werden.

Deutlich hyperreprimiert waren in der NtcA-Mutante im Vergleich zum Wt die Gene, die für Proteine des PS I, PS II, Bestandteile der Phycobilisomen (*apc*, *cpc*), sowie für Proteine des Elektronentransports in der Photosynthese, Cytochrom, Plastocyanin und die für Proteine des NDH-1L-Komplexes kodieren. Stark hyperreprimiert waren in der NtcA-Mutante im Vergleich zum Wt auch die Gene die für Proteine der ATP-Synthase kodieren.

Die Hyperrepression der Gene die für Proteine des Photosystems, der Elektronentransportkette bis hin zur ATP-Generation kodieren, könnte in der NtcA-Mutante zum Verlust an Energie in Form von NADH und ATP führen und dadurch die Regeneration der NtcA-Mutante nach längerem Stickstoffentzug verhindern.

Für die im Wt durch Stickstoffmangel am höchsten induzierten Gene (*nsi5*, *merR*, *2150*, *2149*, *2148*) wurde gezeigt, dass die fünf Gene *nsi5*, *merR*, *2150*, *2149* und *2148* als eine polycistronische mRNA transkribiert werden.

In der PipX-Mutante waren die Transkripte aller NtcA-abhängig induzierten Gene im Vergleich zum Wt deutlich erniedrigt. Dies bestätigt die Annahme, dass PipX für die volle Aktivierung von NtcA benötigt wird. Die durch NtcA reprimierten Gene waren hingegen in der PipX-Mutante nicht beeinträchtigt.

5. Zusammenfassung NblR-Mutante

Unter Ammoniumbedingungen waren in der NblR-Mutante im Unterschied zur NtcA-Mutante die Gene der Proteine der C/N Balance kaum beeinträchtigt. In der NblR-Mutante waren hauptsächlich die Gene des Photosyntheseapparates (*psaK1*, *psaK2*, *psaF*, *petJ*) im Vergleich zum Wt in Ammoniumbedingung reprimiert.

Wurden die nach Stickstoffmangel im Wt induzierten Gene betrachtet und mit den NblR-, NtcA- und PipX-Mutanten verglichen, so wurde kein Gen entdeckt, dessen Induktion nur spezifisch in der NblR-Mutante ausblieb (siehe oben und Anhang). Wurde ein Gen in der NblR-Mutante nicht induziert, so fehlte die Induktion auch in der NtcA- und/oder der PipX-Mutante. Dies deutet darauf hin, dass in der NblR-Mutante das Signal des Stickstoffmangels nicht wahrgenommen werden kann. Die Repression von NtcA-abhängigen Genen war in der NblR-Mutante nicht beeinflusst.

Im Wt wurden die Gene *apc* und *cpc*, die für Proteine des Allophycocyanins und des Phycocyanins kodieren, im Stickstoffmangel reprimiert. In der NblR-Mutante wurden die Gene des Phycocyanins (*cpc*) nicht reprimiert. Somit scheint neben dem Abbau der Phycobilisomen (siehe Abschnitt C diese Arbeit) auch die Inhibition der Transkription von *cpc* in der NblR-Mutante zumindest vorübergehend beeinträchtigt.

Die in der NtcA-Mutante bereits nach 6 h Stickstoffchlorose auftretende starke Repression der Gene der Photosysteme (PS I, PS II), der Phycobilisomen, sowie der NADH Dehydrogenase wurde in der NblR-Mutante nach 24 h Stickstoffchlorose beobachtet. Die Repression des PS I und PS II, der Elektronentransportkette bis hin zur ATP-Generation (ATP-Synthase), könnte somit in der NblR-Mutante zum Energieverlust in Form von NADH und ATP führen und die Regeneration der NblR-Mutante nach vorangegangenen Stickstoffentzug verhindern.

Tabelle 10 Gene, die für Proteine des Stickstoff-Metabolismus kodieren; Transkriptom des Wt, der NblR-, NtcA- und PipX-Mutante nach 6 h und 24 h in Stickstoff-freiem BG11 Medium. Die Tabelle enthält die errechneten Werte aus drei unabhängigen Experimenten inklusive eines dye-swap Experimentes. Die Fold change Werte wurden aus dem $2^{\text{M-Wert}}$ berechnet. Als signifikant induziert oder reprimiert wurden Gene gewertet deren p-Wert $\leq 0,051$ und fold change $\geq 1,68$ bzw. $\leq 0,59$ (fett gedruckt); Als fehlreguliert wurde gewertet, wenn der Unterschied im M-Wert im Vergleich zum Wildtyp $\geq 0,75$ war. Pfeile zeigen eine Operonstruktur an.

JGI ORF	Gene	Annotated Protein Function	Fold change								NtcA?
			Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		
			WT		NblR		NtcA		PipX		
			6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h	
N-Metabolismus											
2279	<i>amtB</i>	Ammonium transporter	2,69	2,08	2,13	1,14	1,04	0,78	1,27	0,90	gtaN8tac
0442	<i>amt1</i>	Ammonium transporter	6,11	4,90	5,90	2,16	0,44	0,64	3,05	1,25	gttN8tac
1240	<i>nirA</i>	Ferredoxin-nitrite reductase	2,00	2,17	1,27	1,06	0,76	0,85	1,00	0,88	gtaN8tac
1239	<i>nrtA</i>	ABC-type nitrate transporter subunit A	3,73	3,60	2,22	1,44	0,65	0,86	1,60	1,57	→
1238	<i>nrtB</i>	ABC-type nitrate transporter subunit B	4,06	3,40	2,28	1,39	0,93	0,82	1,21	1,01	→
1237	<i>nrtC</i>	ABC-type nitrate transporter subunit C	3,66	3,27	2,60	1,52	1,05	1,11	1,85	1,70	→
1236	<i>nrtD</i>	ABC-type nitrate transporter subunit D	2,77	2,22	1,60	1,17	1,33	0,86	1,04	0,86	→
1241	<i>nirB</i>	Nitrite Reductase	1,92	1,43	1,62	1,46	1,21	1,21	1,07	1,12	gtaN8tac
1242	<i>ntcB</i>	Nitrogen assimilation transcription activator NtcB	1,74	1,20	1,28	1,15	1,35	1,01	0,88	0,78	
2107	<i>cynA</i>	Periplasmic-binding protein	8,63	4,07	3,97	0,94	0,88	0,79	1,25	0,97	gtaN8tac
2106	<i>cynB</i>	Sulfonate transport system permease protein	4,82	2,78	2,62	0,86	0,82	0,79	0,92	0,82	→
2105	<i>cynD</i>	ATP-binding protein of sulfonate transport system	4,76	2,38	2,33	0,94	0,85	1,09	1,20	0,93	→
2104	<i>cynS</i>	Cyanase, detoxification of cyanate	2,41	1,50	1,92	0,75	0,79	0,94	1,20	0,82	→
2156	<i>glnA</i>	Glutamine synthetase, type I	2,91	2,42	1,36	0,60	0,40	0,56	0,96	0,60	gtaN8tac
2529	<i>gifB</i>	similar to sll1515 from <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 to glutamine synthetase inactivating factor IF17	0,25	0,22	0,35	0,23	0,96	1,18	0,28	0,61	gtaN8tac
0169	<i>glnN</i>	Glutamine synthetase, type III	2,39	3,80	1,95	2,17	0,81	1,00	1,06	1,44	gtaN9gac
0321	<i>glnB</i>	Nitrogen regulatory protein PII	3,25	2,77	2,69	1,13	0,97	1,07	1,27	0,83	gtaN8tac
0127	<i>ntcA</i>	Transcriptional factor ntcA	2,58	2,21	2,10	1,59	-	-	1,05	0,95	gtaN8tac
1719	<i>icd</i>	isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent	1,72	1,82	1,48	1,38	1,06	1,40	1,54	1,13	gtaN8tac

Tabelle 11 Transkriptom des Wt, der NblR-, NtcA- und PipX-Mutante nach 6 h und 24 h in Stickstoff-freiem BG11 Medium. Die Tabelle enthält die errechneten Werte aus drei unabhängigen Experimenten inklusive eines dye-swap Experimentes. Die Fold change Werte wurden aus dem $2^{M\text{-Wert}}$ berechnet. Als signifikant induziert oder reprimiert wurden Gene gewertet deren p-Wert $\leq 0,051$ und fold change $\geq 1,68$ bzw. $\leq 0,59$ (fett gedruckt); Als fehlreguliert wurde gewertet, wenn der Unterschied im M-Wert im Vergleich zum Wildtyp $\geq 0,75$ war. Pfeile zeigen eine Operonstruktur an. * noch nicht beschriebenes NtcA-Bindemotiv

JGI ORF	Gene	Annotated Protein Function	Fold change								NtcA?
			Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		
			WT		NblR		NtcA		PipX		
			6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h	
N-Katabolismus											
0569	rpoD4	group2 RNA polymerase sigma factor RpoD4	3,20	2,89	7,67	2,10	0,75	0,74	2,71	1,22	gtaN8tac
0568	codA	cytosine deaminase	2,81	1,68	3,01	1,43	1,04	0,80	1,66	0,93	→
1548	0023	acetamidase/formamidase family protein	9,78	7,70	4,63	1,43	1,17	1,34	1,69	1,18	gtaN8tac
1585	mur	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	3,01	3,14	2,62	2,19	1,37	1,61	1,75	1,84	(gtaN7tac)*
0366	1620	putative sulfate transporter	4,03	7,66	3,66	5,11	0,95	1,68	1,99	2,82	gtaN8tac*
Bewegung											
0847	pilT3	twitching mobility protein	2,20	2,14	1,88	1,65	1,09	1,00	1,65	1,21	gtaN8gac*
1015	mcp	methyl-accepting chemotaxis protein	1,74	1,64	1,38	1,45	1,18	1,07	1,34	1,14	
1016	cheW	purine-binding chemotaxis protein CheW	1,67	1,85	1,67	1,65	1,04	1,10	1,26	1,05	
1221	cheY	chemotaxis protein CheY	1,60	2,01	1,30	1,09	1,14	1,18	1,28	1,11	
Weitere NtcA-abhängige Gene?											
1636	dCoH	pterin-4a-carbinolamine dehydratase	4,66	4,62	6,23	2,24	0,95	0,99	2,81	1,51	gtaN8cac*
0934	orf353	Glutamine amidotransferase-phosphoribosyl anthranilate transferase	3,01	3,39	2,25	3,74	1,34	1,14	0,97	1,31	(gtaN7cac)*
0245	gap	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I	1,92	3,38	2,39	3,06	1,13	1,87	2,64	3,01	
0244	glgP	glycogen phosphorylase	1,36	1,85	1,39	1,44	0,89	1,08	1,64	1,76	
2333	opcA	Glucose 6-phosphate dehydrogenase, assembly protein	1,75	2,06	1,39	1,40	1,34	1,17	1,84	1,66	gtaN8tgc*
2102	0631	NAD-reducing hydrogenase gamma-related protein	2,13	1,91	1,72	0,99	0,87	0,96	1,36	1,14	(gtaN7taa)*

Fortsetzung Tabelle 11

24

JGI ORF	Gene	Annotated Protein Function	Fold change								NtcA?
			Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		
			WT		NblR		NtcA		PipX		
			6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h	
1713	<i>mocD</i>	hydrocarbon oxygenase	5,54	5,04	3,36	4,33	1,07	1,24	1,59	2,05	gtaN8tac
2121	<i>0652</i>	similar to anti-sigma f factor antagonist	2,62	2,99	2,95	1,45	1,11	1,63	2,64	1,38	(gtaN7tac)*
0598	<i>nlpD</i>	lipoprotein nlpD	3,66	2,67	2,93	1,78	0,64	0,92	1,93	1,40	gtaN8gac*
1254	<i>2620</i>	cyclic nucleotide dependent protein kinase	1,60	2,41	1,77	1,55	0,94	0,78	1,27	0,90	
2419	<i>0993</i>	ORFG	3,10	2,16	0,99	0,98	0,96	0,88	0,84	0,90	
2466	<i>1044</i>	two-component system response regulator	1,61	2,22	1,51	2,14	0,93	0,75	1,09	1,56	gtaN8tac
0365	<i>1617</i>	two-component response regulator	9,38	7,87	8,88	7,93	2,18	3,40	4,53	7,17	gtaN9taa*
0480	<i>1744</i>	two-component hybrid sensor and regulator	2,81	2,17	2,89	2,70	1,16	1,23	2,50	1,75	
1707	<i>ftn6</i>	cell division protein Ftn6	2,87	3,46	2,04	2,40	1,14	0,88	1,48	1,32	(gttN8aac)*
1438	<i>pmgA</i>	Photomixotrophic growth related protein A homolog	3,48	4,41	2,43	4,18	1,63	2,12	2,58	3,25	gtaN9cac*
1649	<i>0140</i>	rubrerythrin	2,51	2,90	2,33	3,68	1,76	1,78	2,27	2,96	
0157	<i>1375</i>	unknown protein	2,11	2,19	2,46	1,73	0,97	1,28	1,69	1,11	gtaN9taa*
0236	<i>1467</i>	unknown protein	1,06	1,71	3,18	4,46	0,59	0,64	1,27	1,29	
0342	<i>1589</i>	hypothetical protein	6,32	6,68	4,99	4,03	1,59	1,22	2,22	2,50	(gaaN9tac)*
0483	<i>1748</i>	unknown protein	2,10	1,81	1,71	1,02	1,24	1,08	1,80	1,29	(gtaN8aac)*
0686	<i>1977</i>	hypothetical protein	2,35	2,59	2,99	2,94	0,97	0,98	1,29	1,21	gtaN9gac*
0891	<i>2211</i>	hypothetical protein	6,54	12,30	7,06	3,51	0,89	0,77	4,35	3,01	(gtaN8cac)
1036	<i>2374</i>	unknown protein	4,32	4,71	3,71	2,46	1,04	0,95	1,39	1,03	gtaN8tac
1039	<i>2377</i>	unknown protein	3,12	2,54	1,93	1,28	1,13	0,97	1,16	0,92	gtaN8tac
1642	<i>0133</i>	Domain of unknown function	3,34	2,61	2,36	10,04	1,72	1,47	2,10	2,78	
1797	<i>0305</i>	unknown protein	3,92	5,78	3,89	2,03	1,24	1,34	2,41	1,61	
1818	<i>0328</i>	hypothetical protein	3,29	2,25	2,53	2,17	1,18	1,28	2,93	1,71	gttN8tac*
2481	<i>1061</i>	unknown protein	1,85	1,68	1,27	-	1,24	0,82	1,95	-	gtaN7gac*
2598	<i>1194</i>	hypothetical protein	1,91	2,20	1,83	2,89	1,08	1,27	1,80	1,92	gtaN8tgc*

Tabelle 12 Gene, die im Wt nach Stickstoffentzug am stärksten induziert wurden. Transkriptom des Wt, der NblR-, NtcA- und PipX-Mutante nach 6 h und 24 h in Stickstoff-freiem BG11 Medium. Die Tabelle enthält die errechneten Werte aus drei unabhängigen Experimenten inklusive eines dye-swap Experimentes. Die Fold change Werte wurden aus dem $2^{\text{M-Wert}}$ berechnet. Als signifikant induziert oder reprimiert wurden Gene gewertet deren p-Wert $\leq 0,051$ und fold change $\geq 1,68$ bzw. $\leq 0,59$ (fett gedruckt); Als fehlreguliert wurde gewertet, wenn der Unterschied im M-Wert im Vergleich zum Wildtyp $\geq 0,75$ war. Pfeile zeigen eine Operonstruktur an. * noch nicht beschriebenes NtcA-Bindemotiv

JGI ORF	Gene	Annotated Protein Function	Fold change								NtcA?
			Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		
			WT		NblR		NtcA		PipX		
			6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h	
Transcript of genes encoding highest upregulated genes during nitrogen starvation											
1764	0269	hypothetical protein	2,55	3,53	1,73	1,87	0,77	0,86	1,48	1,56	gtaN8aac*
0836	2148	unnamed protein product	3,97	2,48	1,85	1,29	0,95	0,74	1,13	0,96	
0837	2149	acetyltransferase, GNAT family	6,82	4,57	3,10	1,52	1,06	0,84	1,44	1,14	
0838	2150	unnamed protein product	5,13	3,65	2,22	1,17	1,09	0,79	1,18	0,96	
0839	merR	aliphatic nitrilase	14,12	12,23	7,57	3,43	1,11	0,90	3,16	2,74	
0840	nsi5	unnamed protein product	12,73	10,45	6,87	3,17	1,28	0,81	2,36	1,83	gtaN8tac
0841	2153	Predicted flavoprotein involved in K+ Transport	7,36	14,18	6,92	9,93	1,20	1,39	3,86	2,96	gtaN8tac

Tabelle 13 Gene, die im Wt nach Stickstoffentzug reprimiert wurden. Transkriptom des Wt, der NblR-, NtcA- und PipX-Mutante nach 6 h und 24 h in Stickstoff-freiem BG11 Medium. Die Tabelle enthält die errechneten Werte aus drei unabhängigen Experimenten inklusive eines dye-swap Experimentes. Die Fold change Werte wurden aus dem 2M-Wert berechnet. Als signifikant induziert oder reprimiert wurden Gene gewertet deren p-Wert $\leq 0,051$ und fold change $\geq 1,68$ bzw. $\leq 0,59$ (fett gedruckt); Als fehlreguliert wurde gewertet, wenn der Unterschied im M-Wert im Vergleich zum Wildtyp $\geq 0,75$ war.

JGI ORF	gene	Annotated Protein Function	Fold change								NtcA?
			Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		
			WT		NblR		NtcA		PipX		
			6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h	
1426	<i>rbcL</i>	Ribulose-bisphosphate carboxylase large chain	0,32	0,20	0,22	0,18	0,58	0,50	0,71	0,22	
1427	<i>rbcS</i>	Ribulose bisphosphate carboxylase, small subunit	0,32	0,22	0,25	0,18	0,60	0,36	0,63	0,20	
2529	<i>gifB</i>	similar to sl11515 from <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 to glutamine synthetase inactivating factor IF17	0,25	0,22	0,35	0,23	0,96	1,18	0,28	0,61	gtaN8tac
0624	<i>ldpA</i>	light dependent period	0,44	0,48	0,78	0,85	0,57	0,80	0,64	0,86	
1428	<i>purK</i>	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, ATPase subunit	0,38	0,38	0,99	0,54	0,44	0,64	0,65	0,52	
0700	<i>1992</i>	universal stress protein family domain protein	0,44	0,48	0,71	1,42	0,90	1,37	0,91	1,54	
1831	<i>0342</i>	IMP dehydrogenase family protein	0,49	0,45	0,51	0,32	0,55	0,73	0,60	0,45	gtaN8cac
1845	<i>0357</i>	unknown protein	0,16	0,15	0,36	0,34	0,46	0,64	0,26	0,27	gtaN8tac
0900	<i>2223</i>	hypothetical protein	0,49	0,35	0,75	0,51	1,32	1,39	0,43	0,69	
1421	<i>ccmK</i>	carbon dioxide concentrating mechanism protein K	0,38	0,28	0,30	0,20	0,78	0,86	0,54	0,30	
1422	<i>ccmL</i>	carbon dioxide concentrating mechanism protein L	0,24	0,14	0,14	0,10	0,52	0,23	0,26	0,10	
1423	<i>ccmM</i>	carbon dioxide concentrating mechanism protein M	0,30	0,21	0,23	0,17	0,18	0,13	0,29	0,15	

Tabelle 14 Gene, die für Proteine des Energiestoffwechsels kodieren; Transkriptom des Wt, der NblR-, NtcA- und PipX-Mutante nach 6 h und 24 h in Stickstoff-freiem BG11 Medium. Die Tabelle enthält die errechneten Werte aus drei unabhängigen Experimenten inklusive eines dye-swap Experimentes. Die Fold change Werte wurden aus dem $2^{\text{M-Wert}}$ berechnet. Als signifikant induziert oder reprimiert wurden Gene gewertet deren p-Wert $\leq 0,051$ und fold change $\geq 1,68$ bzw. $\leq 0,59$ (fett gedruckt); Als fehlreguliert wurde gewertet, wenn der Unterschied im M-Wert im Vergleich zum Wildtyp $\geq 0,75$ war. Pfeile zeigen eine Operonstruktur an.

JGI ORF	gene	Annotated Protein Function	Fold change							
			Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄	
			WT		NblR		NtcA		PipX	
			6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h
1343	<i>ndhA</i>	NADH dehydrogenase subunit 1	1,10	1,13	0,93	0,56	0,59	0,46	1,08	0,49
1344	<i>ndhI</i>	NADH dehydrogenase, subunit I	0,93	0,91	0,78	0,50	0,62	0,42	0,95	0,49
1345	<i>ndhG</i>	NADH dehydrogenase subunit VI	0,95	0,92	0,74	0,43	0,45	0,34	0,84	0,39
1346	<i>ndhE</i>	NADH dehydrogenase subunit IV	0,77	0,85	0,66	0,48	0,41	0,28	0,74	0,35
1415	<i>ndhB</i>	NADH dehydrogenase subunit II	0,82	0,81	0,84	0,45	0,53	0,61	0,91	0,59
1977	<i>ndhF1</i>	NADH dehydrogenase subunit V	1,16	1,13	0,93	0,61	0,36	0,24	1,19	0,50
0329	<i>1574</i>	possible methyltransferase	0,60	0,48	0,76	1,03	0,37	0,41	0,36	0,30
0330	<i>atp1</i>	ATP synthase protein I	0,66	0,53	0,26	0,11	0,21	0,09	0,56	0,17
0331	<i>atpB</i>	ATP synthase F0, a chain	0,78	0,73	0,38	0,24	0,39	0,27	0,73	0,34
0332	<i>atpE</i>	ATP synthase F0, c chain, lipid binding	0,63	0,42	0,25	0,16	0,14	0,13	0,54	0,19
0333	<i>atpG</i>	ATP synthase F0, b' chain subunit II	0,47	0,38	0,17	0,08	0,10	0,05	0,35	0,11
0334	<i>atpF</i>	ATP synthase F0, b chain subunit I	0,42	0,36	0,18	0,18	0,12	0,10	0,31	0,15
0335	<i>atpH</i>	ATP synthase F1, δ -chain	0,47	0,39	0,25	0,25	0,14	0,15	0,38	0,18
0036	<i>atpA</i>	ATP synthase F1, α - chain	0,56	0,47	0,28	0,24	0,16	0,15	0,41	0,20
0337	<i>atpG</i>	ATP synthase F1, γ - chain	0,77	0,62	0,52	0,33	0,31	0,27	0,51	0,25
2315	<i>atpD</i>	ATP synthase F1, β -chain	0,84	0,58	0,29	0,22	0,30	0,34	0,62	0,33

Tabelle 15 Gene, die für Proteine der Photosysteme und der Phycobilisomen kodieren Transkriptom des Wt, der NblR-, NtcA- und PipX-Mutante nach 6 h und 24 h in Stickstoff-freiem BG11 Medium. Die Tabelle enthält die errechneten Werte aus drei unabhängigen Experimenten inklusive eines dye-swap Experimentes. Die Fold change Werte wurden aus dem $2^{\text{M-Wert}}$ berechnet. Als signifikant induziert oder reprimiert wurden Gene gewertet deren p-Wert $\leq 0,051$ und fold change $\geq 1,68$ bzw. $\leq 0,59$ (fett gedruckt); Als fehlreguliert wurde gewertet, wenn der Unterschied im M-Wert im Vergleich zum Wildtyp $\geq 0,75$ war. Pfeile zeigen eine Operonstruktur an.

JGI ORF	gene	Annotated Protein Function	Fold change							
			Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄	
			WT		NblR		NtcA		PipX	
			6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h
2049	<i>psaA</i>	Photosystem I reaction center core protein A	0,72	0,77	0,87	0,47	0,40	0,17	0,91	0,52
2048	<i>psaB</i>	Photosystem I reaction center core protein B	0,67	0,69	0,71	0,38	0,28	0,15	0,80	0,43
0535	<i>psaC</i>	Photosystem I reaction center subunit VII, F _A and F _B [4Fe-4S]	0,81	0,80	0,81	0,22	0,14	0,06	0,60	0,18
1002	<i>psaD</i>	Photosystem I reaction center subunit II, Fe docking and PsaC binding	0,85	0,81	0,82	0,34	0,95	0,21	0,78	0,37
1322	<i>psaE</i>	Photosystem I reaction center protein subunit IV, Fe/Fv docking, cyclic electron transport	0,80	0,75	0,78	0,51	0,35	0,43	0,80	0,55
1157	<i>psaF</i>	Photosystem I reaction center subunit III	0,32	0,27	0,51	0,18	0,07	0,07	0,29	0,12
2343	<i>psaI</i>	Photosystem I reaction center subunit VIII	0,44	0,34	0,46	0,18	0,11	0,09	0,47	0,20
1249	<i>psaJ</i>	Photosystem I reaction center subunit IX	0,43	0,44	0,60	0,22	0,09	0,06	0,36	0,13
2342	<i>psaL</i>	Photosystem I reaction center subunit XI	0,43	0,32	0,42	0,21	0,12	0,11	0,42	0,20
0424	<i>psbA</i>	Photosystem II D1 protein	0,93	0,87	1,04	0,96	0,82	0,53	1,01	0,51
0697	<i>psbB</i>	Photosystem II CP47 light harvesting antenna protein	0,54	0,42	0,94	0,32	0,22	0,17	0,52	0,24
1177	<i>psbE</i>	Photosystem II Cytochrome b559, α -subunit	0,73	0,86	0,67	0,51	2,43	0,42	0,82	0,59
0225	<i>psbH</i>	Photosystem II reaction center protein H	0,74	0,88	0,55	0,46	0,74	1,08	0,72	0,75
1175	<i>psbL</i>	Photosystem II reaction center protein L	0,81	0,89	0,73	0,58	0,41	0,39	0,90	0,57
0294	<i>psbO</i>	Photosystem II Mn- and Ca-stabilizing protein	0,28	0,23	0,39	0,24	0,14	0,11	0,29	0,15
0696	<i>psbT</i>	Photosystem II reaction center protein T	0,65	0,67	0,93	0,49	0,32	0,20	0,61	0,24

Forsetzung Tabelle 15

JGI ORF	gene	Annotated Protein Function	Fold change							
			Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄	
			WT		NblR		NtcA		PipX	
			6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h
2010	<i>psbV</i>	Cytochrome c550	0,32	0,27	0,35	0,27	0,16	0,15	0,25	0,15
1088	<i>petE</i>	Plastocyanin	0,52	0,56	0,41	0,32	0,36	0,60	0,66	0,76
1630	<i>petJ</i>	Apocytochrome c6 precursor (Cyt c553)	0,54	0,28	0,69	0,23	0,23	0,17	0,57	0,21
1615	<i>petM</i>	cytochrome b6-f complex subunit M	0,55	0,66	0,53	0,34	0,44	0,38	0,51	0,37
0327	<i>apcA</i>	Allophycocyanin α -subunit	0,32	0,30	0,44	0,29	0,11	0,07	0,31	0,12
2158	<i>apcB</i>	Allophycocyanin, β -subunit (1)	0,43	0,39	0,43	0,19	0,19	0,16	2,14	0,22
0326	<i>apcB</i>	Allophycocyanin, β -subunit (2)	0,40	0,45	0,56	0,41	0,18	0,10	0,33	0,15
0325	<i>apcl</i>	Allophycocyanin linker protein	0,18	0,16	0,29	0,18	0,06	0,05	0,17	0,10
0328	<i>apcE</i>	Allophycocyanin anchor protein	0,22	0,19	0,44	0,25	0,13	0,10	0,23	0,13
1048	<i>cpcA</i>	Phycocyanin, α -subunit (1)	0,56	0,59	0,91	0,58	0,13	0,07	0,45	0,19
1048	<i>cpcA</i>	Phycocyanin, α -subunit (2)	0,65	0,68	0,92	0,66	0,15	0,08	0,46	0,19
1052	<i>cpcB</i>	Phycocyanin, β -subunit (1)	0,45	0,47	0,86	0,53	0,12	0,06	0,34	0,14
1052	<i>cpcB</i>	Phycocyanin, β -subunit (2)	0,45	0,51	0,80	0,52	0,11	0,07	0,37	0,13
1049	<i>cpch</i>	30 kD Rod-rod linker	0,27	0,25	0,63	0,30	0,13	0,14	0,30	0,15
1050	<i>cpcl</i>	33 kD Phycocyanin linker protein	0,19	0,20	0,66	0,27	0,06	0,06	0,22	0,09

Abschnitt C

Charakterisierung des globalen

***Response Regulators* NblR**

bei Stickstoff- und Schwefelmangel in

***Synechococcus elongatus* PCC 7942**

C - Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme

2.1.1. Cyanobakterien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *S. elongatus* sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16 verwendete Stämme von *S. elongatus*

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>S. elongatus</i> PCC 7942	Wildtyp	Kuhlemeier <i>et al.</i> , 1983
<i>S. elongatus</i> . PCC 7942 NblR	<i>nblR::kan^R</i>	Schwarz und Grossman, 1998
<i>S. elongatus</i> . PCC 7942 NtcA	<i>ntcA::kan^R</i>	Sauer <i>et al.</i> , 1999
<i>S. elongatus</i> PCC 7942 Nsi5	<i>nsi5::kan^R</i>	diese Arbeit
<i>S. elongatus</i> PCC 7942 MerR	<i>merR::kan^R</i>	diese Arbeit
<i>S. elongatus</i> PCC 7942 2150	<i>2150::kan^R</i>	diese Arbeit
<i>S. elongatus</i> PCC 7942 2149	<i>2149::kan^R</i>	diese Arbeit
<i>S. elongatus</i> PCC 7942 2148	<i>2148::kan^R</i>	diese Arbeit

2.1.2. *Escherichia coli*

Für Klonierungen und Proteinüberproduktionen wurden die folgenden *E. coli* Stämme verwendet:

Tabelle 17 verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi1, hsdR17, relA1, supE44, lac</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>F-, ompT, hsdSB, λDE3</i>	Großberg und Dunn, 1988
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44, ΔlacU169, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1,</i>	Hanahan, 1983

2.2. Kultivierungsbedingungen

2.2.1. Kulturmedien zur Anzucht von Cyanobakterien

Cyanobakterien wurden in BG11-Medium nach Rippka (1988) kultiviert. Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden in zweifach destilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert oder sterilfiltriert.

Spurenelementlösung: (Endkonzentration)	H ₃ BO ₄	46	μM
	MnCl ₂ x 2 H ₂ O	9,2	μM
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,77	μM
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	1,6	μM
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,32	μM
	Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O	0,17	μM
BG11-Grundmedium (Endkonzentration)	K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	0,175	mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,3	mM
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,25	mM
	Zitronensäure	0,028	mM
	Fe-Citrat	0,028	mM
	EDTA	0,0034	mM
	Na ₂ CO ₃	0,375	mM
	Spurenelementlösung	1	ml/l

In der Arbeit verwendete Medien bestehen aus dem Grundmedium und folgenden Additiven:

BG11 ^N -Flüssigmedium				
Nitrat als Stickstoffquelle:	NaNO ₃	17,6	mM	
BG11 ⁰ -Flüssigmedium				
stickstofffreies Medium:	entspricht BG11-Grundmedium			
BG11 ^A -Flüssigmedium				
Ammonium als Stickstoffquelle:	NH ₄ Cl	5	mM	
	HEPES pH 7,8	20	mM	
BG11 ^S -Flüssigmedium				
Schwefelmangel Medium:	NaNO ₃	17,6	mM	
	statt MgSO ₄ -> MgCl ₂			

Die Medien wurden autoklaviert und vor dem Beimpfen mit 5 mM NaHCO₃ (sterilfiltriert) versetzt. Zur Herstellung von BG11-Platten wurden zusätzlich 8 g/l Agar und 1 mM Na₂S₂O₃ zugegeben. Zur Aufrechterhaltung der Mutationen wurden je nach Bakterienstamm folgenden Antibiotikakonzentrationen zugesetzt:

Antibiotika:	Kanamycin:	50 µg/ml
	Spectinomycin:	35 µg/ml
	Chloramphenicol:	5 µg/ml

2.2.2. Kulturmedien zur Anzucht von *E. coli*

E. coli Zellen wurden in Luria-Bertani (LB) Medium nach Sambrock *et al.* (1989) angezogen. Festmedium (LB-Platten) wurden durch Zugaben von 15 g/l Agar-Agar (Roth) hergestellt.

LB-Flüssigmedium:	Pepton	1,0 %
(Luria-Bertani)	Hefeextrakt	0,5 %
	NaCl	0,5 %

2.2.3. Anzucht und Kultivierungsbedingungen von Cyanobakterien

Die Anzucht von *S. elongatus* Stämmen erfolgte in sterilen 500 ml Schikanekolben, die mit 100 ml BG11-Medium und entsprechenden Zusätzen (siehe oben) befüllt waren. Die Kolben wurden mit Silikon-Kappen, die für eine optimale Belüftung sorgen, verschlossen. Für physiologische Experimente wurden die Stammkulturen auf eine optische Dichte (OD_{750}) von 0,2 - 0,3 angeimpft und für zwei Tage bis zu einer OD_{750} von 0,6 - 0,7 kultiviert. Für die Anzucht größerer Bakterienmengen wurden 5 l Erlenmeyerkolben, die maximal 1 l BG11^N-Medium enthielten, mit einer Vorkultur ($OD_{750}=1$) beimpft.

Die Anzucht erfolgte photoautotroph bei 28 °C und einer konstanten Beleuchtung von 40 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ (Lumilux de Lux, Daylight, Osram). Zur optimalen Belüftung wurden die Kulturen auf einem Schüttler bei 130-140 rpm herangezogen. Größere Kulturen wurden auf einem Rührer gleichmäßig durchmischt. Das Wachstum der Kulturen wurde durch die Messung der optischen Dichte in einem Ultrospec 3000 Spektralphotometer (Amersham Pharmacia, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 750 nm verfolgt.

Die flüssigen Stammkulturen von Cyanobakterien wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 40 ml BG11^N- oder BG11^A-Medium bei geringer Lichtintensität von ca. 10 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ stehend gelagert. Jede Stammkultur wurden zusätzlich bei -80 °C (Zellen in 1 ml ½ BG11, 8 % DMSO) aufbewahrt. Zur Reaktivierung der tiefgefrorenen

Zellen wurde etwas Kultur auf eine BG11-Agarplatte ausgestrichen oder direkt in Flüssigmedium bei sehr schwachem Licht angezogen.

2.2.4. Induktion von Stress (Stickstoffmangel, Schwefelmangel)

Für die Induktion von Mangelbedingungen wurden die Cyanobakterien, wie oben beschrieben, bis zu einer exponentiellen Wachstumsphase OD_{750} 0,7 in BG11^N- (Nitrat) oder BG11^A- (Ammonium) Medium schüttelnd inkubiert. Durch Vakuumfiltrierung über einen Membranfilter (0,45 µm HV, Millipore) wurden das Anzuchtmedium der Zellen durch stickstofffreies (BG11⁰) oder schwefelfreies (BG11^S) Medium ausgetauscht. Zur Kontrolle wurde ein Teil der Zellen wieder im Anzuchtmedium resuspendiert. Die Zelldichte wurde auf OD_{750} von 0,4 - 0,5 eingestellt und die Zellen wieder unter Standardbedingungen (40 µmol Photonen $m^{-2} s^{-1}$, 28 °C) schüttelnd inkubiert.

2.2.5. Regenerationsfähigkeit von *S. elongatus* Zellen

Zur Überprüfung der Überlebensfähigkeit und der Regenerationsfähigkeit der Zellen wurden 10 µl der entsprechenden Kultur mit einer OD_{750} 0,5 auf eine BG11^N-Platte getropft. Zusätzlich wurden die colony forming units (cfu) ermittelt. Hierzu wurden je 100 µl einer 10^{-4} bis 10^{-7} verdünnten Kultur auf BG11^N-Platten ausgestrichen. Alle Ansätze wurden für einige Tage bei 20 µmol Photonen $m^{-2} s^{-1}$ und 28 °C inkubiert.

2.2.6. Anzucht von *E. coli* Zellen

Die *E. coli*-Zellen wurden in LB-Flüssigmedium kultiviert. Die Anzucht erfolgte in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben. Zur Selektion wurde das entsprechende Antibiotikum (Ampicillin 100 µg/ml) zugefügt und die Zellen auf einem Rundschüttler bei 37 °C angezogen.

2.3. Zellernte für RNA-Isolierung und Proteinanalysen

Die Zellen für die RNA-Isolierung wurden in Zentrifugenbecher gegeben, die halbhoch mit Eis befüllt waren. Anschließend wurden die Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei 7500 rpm und 4 °C geerntet. Die Lagerung der Zellsedimente erfolgte bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C. Zellen für Proteinanalysen und kleinere Kulturproben

wurden nach Abkühlen in flüssigem Stickstoff bei 14000 rpm und 4 °C für eine Minute pelletiert.

2.4. Molekularbiologische Techniken

2.4.1. Isolierung von genomischer DNA aus *S. elongatus* Zellen

Für die Isolierung von genomischer DNA wurden 10 ml einer *S. elongatus* Kultur (OD_{750} von 0,7 - 0,8) durch Zentrifugation (14.000 rpm, 5 min) geerntet. Das Zellpellet wurde in 567 µl TE-Puffer resuspendiert. Der Aufbruch der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 30 µl 10 % SDS und 3 µl Proteinase K-Lösung (Stammlösung 20 mg/ml) und einer Inkubation für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurden 100 µl 5 M NaCl und 80 µl CTAB/NaCl zugeben und nach gründlichem Mischen für 10 min bei 65 °C inkubiert. Zur Reinigung von Proteinen wurde die Suspension mit 780 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und zentrifugiert (14.000 rpm, 5min). Der Überstand mit der DNA wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt und zentrifugiert (14.000 rpm, 5 min). Zur Fällung der DNA wurde der Überstand mit 0,6-fachem Volumen Isopropanol versetzt und erneut zentrifugiert (14.000 rpm, 30 min). Das mit 1 ml 70 % igem Ethanol gewaschene Pellet wurde in der SpeedVac getrocknet. Die DNA wurde in 40 µl A.bidest resuspendiert und bei 4 °C gelagert.

TE-Puffer

1 mM EDTA
10 mM Tris-HCl, pH 8,0

CTAB/NaCl-Lösung (50 ml) in 65 °C lösen

2,05 g NaCl
5 g Cetyl trimethyl ammonium bromide

2.4.2. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* für analytische Zwecke erfolgte nach Alkalischer Lyse. Die Qualität der isolierten DNA war hinreichend für Restriktionsversuche. Die Zellen einer 3 ml Übernachtskultur in LB-Amp-Medium wurden durch Zentrifugation geerntet und in 100 µl Puffer I (Resuspension) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer II (Lysis-Puffer) wurde der Ansatz vorsichtig geschwenkt und 5 min bis zur Lyse der Zellen auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von SDS wurden zelluläre Proteine, chromosomale DNA und Plasmid-DNA denaturiert. Das Lysat wurde

mit 150 µl der Lösung III neutralisiert und auf Eis 10 min inkubiert. Nach einer Zentrifugation (14.000 rpm, 15 min, 4 °C) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und vom Proteinpräzipitat und der chromosomalen DNA getrennt. Durch Zugabe von 0,7-fachem Volumen Isopropanol wurde die DNA gefällt, durch Zentrifugation (14.000 rpm, 15 min, 4 °C) sedimentiert und anschließend mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde luftgetrocknet und dann in 40 µl H₂O gelöst.

Lösung I		Lösung II		Lösung III	
50 mM	Glucose	200 mM	NaOH	3 M	Kaliumacetat,
25 mM	Tris-HCl, pH 8,0	1 %	SDS		pH 5,2
10 mM	EDTA				
20 mg/ml	RNase A				

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* für Klonierungsschritte und Sequenzierung wurde die Plasmid-Mini-Präparation von Sigma (München) verwendet, deren Reinigungsprinzip auf einer optimierten alkalischen Lyse und einer Anionenaustauschchromatographie basiert. Alle Schritte wurden nach Herstellerangaben bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.4.3. Isolierung von Gesamt-RNA aus *S. elongatus* Zellen

Für die Isolierung von RNA wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet. Für die Mikroarray-Analysen wurde die RNA nach einem modifizierten Protokoll nach Qiagen isoliert. Für die Northern-Blot Analysen und die semiquantitative RT-PCR wurde die RNA nach Roche aufgereinigt. Die *S. elongatus* Zellen wurden zu bestimmten Zeitpunkten, wie oben beschrieben, geerntet und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

2.4.3.1. RNA-Isolierung modifiziert nach Qiagen

Für die RNA-Isolierung nach Qiagen wurden die Zellpellets aus 30 ml Zellen OD₇₅₀ 0,6 in 200 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert und mit eiskaltem RLT Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen, + 10 µl/ml β-Mercaptoethanol versetzt. Die Zellen wurden in verschraubbare Eppendorfcups mit einem Volumenteil Glasperlen (0,1 mm, Braun, Melsungen) überführt und innerhalb von 2x 30 s bei Stufe 6,5 im Ribolyser (Hybaid-AGS, Heidelberg) aufgebrochen. Nach einer Inkubation von 3 min auf Eis wurde die Zellsuspension zweimal bei 13.000 g für 3 min und 4 °C zentrifugiert und der Überstand

in ein neues Gefäß überführt. Je 450 µl Lysat wurde mit 250 µl 98 % Ethanol vermischt und auf eine RNeasy Säule geladen, mit 500 µl RW1 Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) und zweimal mit RPE Puffer gewaschen. Die RNA wurde mit zweimal 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Ein DNase-Verdau erfolgte mit dem *RNase free DNase Set* (Qiagen) um restliche genomische DNA zu entfernen. Ein Reaktionsansatz enthielt: 60 µl RNA, 6 µl RDD Puffer, 3 µl DNase. Der Ansatz wurde für 1 h bei 30 °C inkubiert. Zur Entfernung der DNase wurde 241,5 µl RLT Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) und 172,5 µl 98 % Ethanol zugegeben und der Ansatz erneut auf eine RNeasy Säule geladen und mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen. Durch Zugabe von 10 µl DNase und 70 µl RDD Puffer erfolgte ein weiterer DNase-Verdau direkt auf der Säule für 15 min bei RT. Im Anschluss wurde die Säule mit 350 µl RW1 Puffer und 500 µl RPE Puffer gewaschen und die RNA in 50 µl RNase freiem Wasser eluiert. Die Qualität und die Reinheit der RNA-haltigen Lösungen wurden photometrisch bestimmt, sowie über ein Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel kontrolliert. Eine Kontamination mit chromosomaler DNA wurde durch eine PCR, die bei reiner RNA kein PCR-Produkt zeigte, ausgeschlossen. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.3.2. RNA-Isolierung modifiziert nach Roche

Für die RNA-Isolierung nach Roche wurden die Zellpellets aus nur 10 ml Zellen $OD_{750} \approx 0,6$ mit eiskaltem PBS Puffer gewaschen und die Pellets in 200 µl PBS Puffer und 350 µl Lysis Puffer (siehe unten) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl 65 °C warmen Phenols (in Wasser gelöstes Phenol, saurer pH) wurden die Zellen für 10 min bei 65 °C inkubiert und jede Minute gründlich gemischt. Anschließend wurde auf Eis 300 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt und die Suspension für 5 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die obere RNA-haltige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, noch einmal mit 500 µl Chloroform behandelt und zentrifugiert (14.000 rpm, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde vorsichtig von der Chloroformphase getrennt und in einem neuen Gefäß mit 250 µl 96 % Ethanol versetzt. Die nun folgenden Schritte wurden nach Herstellerangaben des *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Suspension wurde auf eine Säule geladen und für 15 s bei 8.000 g zentrifugiert. Der nun folgende DNase Verdau erfolgte direkt auf der Säule (90 µl DNase Inkubations Puffer, 10 µl DNase) bei Raumtemperatur für 60 min.

Anschließend wurde die Säule mit Puffer I und II gewaschen. Die RNA konnte mit 50 µl und 100 µl Elutionspuffer (RNase-freies Wasser) eluiert werden. Die Qualität und die Reinheit der RNA-haltigen Lösungen wurden photometrisch bestimmt sowie über ein Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel kontrolliert. Eine Kontamination mit chromosomaler DNA wurde durch eine PCR, die bei reiner RNA kein PCR-Produkt zeigte, ausgeschlossen. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Lysis-Puffer

4 M Guanidinthiocyanat
20 mM Na-Acetate, pH 5,2
vorsichtig bei 65 °C lösen, pH einstellen
0,1 mM DTT
0,5 % N-Lauryl-Sarcosin
sterilfiltrieren, -20 °C lagern

PBS-Puffer (pH 7,4)

8 g NaCl
0,2 g KCl
1,44 g Na₂HPO₄
0,24 g KH₂PO₄

2.4.4. Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion ist eine *in vitro* Methode zur selektiven Amplifikation eines definierten DNA-Abschnittes. Bei der präparativen Amplifikation von kodierenden Bereichen wurde die *Pfu*-Polymerase verwendet. Die *Pfu*-Polymerase besitzt im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase eine Korrekturlesefunktion (3'-5'-Exonuklease-Aktivität). Die Temperatur für die Hybridisierung ist abhängig von der Basenzusammensetzung und die Synthesezeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments (ca. 1 min pro 1 kb). Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne *template*.

Ein 50 µl PCR-Ansatz enthielt in 1x PCR Puffer mit 20 mM MgSO₄:

<i>template</i>	90	ng genomische DNA oder 20 ng Plasmid DNA
5'Oligonukleotid	20	pmol
3'Oligonukleotid	20	pmol
dNTP's	0,2	mM pro dNTP
<i>Pfu</i> -Polymerase	1,2	U

Die PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1.	Initiale Denaturierung	5	min	94	°C
2.	25 x 3-Schritt-Zyklus:				
	Denaturierung	1	min	94	°C
	Hybridisierung	1	min	53-59	°C
	Synthese	2,5	min	72	°C
3.	Endsynthese	10	min	72	°C

Bis zur weiteren Verwendung der Proben wurden die Ansätze bei 4 °C gelagert. Die amplifizierten DNA-Abschnitte wurden mit Hilfe eines *PCR Purification Kits* (Qiagen, Hilden) gereinigt.

2.4.4.1. Ganz-Zell-PCR aus *S. elongatus* Zellen

Bei einer PCR mit vollständigen Zellen (Ganz-Zell-PCR) diente als *template* entweder eine Kolonie von einer Platte oder eine pelletierte und gewaschene Zellkultur ($OD_{750} \approx 1$). Die Zellen wurden in A.bidest resuspendiert und für einen 100 µl PCR-Ansatz wurden 76 µl der Zellsuspension (sollte nur schwach grün sein, aus BG11^N Kultur) für 5 min auf 96 °C erhitzt um die Zellen zu denaturieren. Anschließend wurde folgender PCR-Ansatz zu der Zellsuspension zugegeben und die PCR wie oben beschrieben durchgeführt.

PCR-Ansatz:	(100 µl Gesamtvolumen)	
10x Polymerase Puffer	1	X
5' und 3' Oligonukleotid	20	pmol
dNTP's	0,2	mM pro dNTP
<i>Pfu</i> -Polymerase	1	U

2.4.4.2. Ganz-Zell-PCR aus *E. coli* Zellen

Eine Ganz-Zell-PCR aus *E. coli* Zellen wurde durchgeführt um transformierte und selektionierte Zellen auf die Richtigkeit des Plasmides und Inserts zu untersuchen. Bei dieser PCR (20 µl) wurde die Taq-Polymerase sowie ein spezieller Taq-Puffer mit Betain verwendet.

Mit einem sterilen Zahnstocher wurde die zu untersuchende Kolonie von Platte gepickt, auf eine neue Platte ausgestrichen (inkubiert bei 37 °C) und parallel das PCR-Cup beimpft. Das PCR-Protokoll blieb dabei wie oben beschrieben. Diese Methode ermöglicht es innerhalb weniger Stunden einen Klon mit gesuchtem Insert zu erkennen und für die Plasmidisolierung vorzubereiten.

2,5x Betain Puffer

3,3 M	Betain-Tris [5M]
250 µg/ml	BSA
2,5 mM	MgSO ₄
125 mM	KCl

Betain-Tris

5 M	Betain
113 mM	Tris-HCl
100 ml: 2g Tris in 80 ml A.bidest lösen, Betain zugeben (löst sich schwer), pH einstellen	

2.4.4.3. Semi-quantitative RT-PCR

In der semi-quantitativen RT-PCR kann die Expressions ausgewählter Gene untersucht werden. Die PCR wurde mit dem *OneStep RT-PCR Kit* (Qiagen) durchgeführt. Während des ersten Programmschritts wird die als *template* eingesetzte RNA durch die Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Nach Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgt eine Standard-PCR.

Es wurde folgender Ansatz 15 µl gewählt:

RNA	60	ng	RNase-Inhibitor	0,1	µl
5`Oligonukleotid	18	pmol	Enzym-Mix	0,6	µl
3`Oligonukleotid	18	pmol	5x Puffer	3	µl
dNTP's	0,6	µl	A.bidest	x	µl

Die PCR wurde in einem Thermocycler (SensoQuest) mit folgendem Standardprogramm durchgeführt:

1. RT-Reaktion	30 min	50 °C
2. Inaktivierung der rev.Transkriptase	15 min	95 °C
3. 18-25 x 3-Schritt-Zyklus:		
Denaturierung	1 min	94 °C
Hybridisierung	30 sec	58 °C
Synthese	30 sec	72 °C
4. Endsynthese	7 min	72 °C

Alle PCR Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert.

2.4.5. Herstellung der Deletions-Mutanten

Für die Deletion wurden die entsprechenden Gene durch ein Kanamycinresistenz-Gen aus dem Plasmid pVZ322 ersetzt. Dieses entspricht der Nukleotidsequenz des Kanamycin-Resistenz Transposons Tn903 (Oka *et al.*, 1981). Für eine homologe Rekombination wurden zusätzlich etwa 500 - 700 bp flankierende Sequenzen *upstream* und *downstream* des auszuschaltenden Genes amplifiziert. Das gesamte Produkt für die homologe Rekombination wurde durch PCR in zwei Teilschritten hergestellt. In der ersten PCR-Reaktion erfolgten die Amplifikation der Kanamycin-Kassette und die Amplifikation der flankierenden Sequenzen. Die reversen Oligonukleotide der *upstream* flankierenden Sequenzen (Rev_up_xx, siehe Abb. 36) sowie die forward Oligonukleotide der *downstream* Sequenzen (Fw_dn_xx, siehe Abb. 36) enthielten am jeweiligen 5`-Ende

überlappende Sequenzen der Kanamycin-Kassette. Die Sequenzen der Oligonukleotide wurden wie folgend gewählt:

Tabelle 18 Name und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide für Knockout. Die überlappenden Sequenzen mit der Kanamycin-Kassette sind klein geschrieben.

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5' ... 3'
für Kanamycin-Kassette:	
Kana-for	5'-CCT CGT GAA GAA GGT GTT GCT GAC-3'
dn_Kanares _(neu)	5'-CAA CCA ATT AAC CAA TTC TGA TTG G-3'
für flankierende Sequenzen:	
Rev_up_xx	5'-GTC AGC AAC ACC TTC TTC ACG AGG G-Gen spezifische Sequenz -3'
Fw_dn_xx	5'-TAA TCA GAA TTG GTT AAT TGG GTT G-Gen spezifische Sequenz -3'
Nsi-Mutante:	
Fw_up_nsi5	5'-GACAATTGACTCCGGCAAGC-3'
Rev_up_nsi5	5'-gtcagcaacaccttcttcacgaggGGGAAAATCTGCAATTAGAACG-3'
Fw_dn_nsi5	5'-taatcagaattgggttaattggttgTTCAAGTTGGTTTTTAGGATTCT-3'
Rev_dn_nsi5	5'-CAACCAAGCCGTCGAGCTG-3'
MerR-Mutante:	
Fw_up_merR	5'-CGATCGCGGTCAACTAGGTA-3'
Rev_up_merR	5'-gtcagcaacaccttcttcacgaggCGCTTCTGCCTAAGAATCCTA-3'
Fw_dn_merR	5'-taatcagaattgggttaattggttgGAGGACTATCTCCATGCCTAA-3'
Rev_dn_merR	5'-TGCATGCCAGACTGTTGAC-3'
2150-Mutante:	
Fw_up_02d	5'-CAGGGCTGCTCGACAGCAT-3'
Rev_up_02d	5'-gtcagcaacaccttcttcacgaggCGTTGACTTAGGCATGGAGAT-3'
Fw_dn_02d	5'-taatcagaattgggttaattggttgTCCCTGTCTCTTCTTATTTGTC-3'
Rev_dn_02d	5'-GTCATGCGGCTTGACGAC-3'
2149-Mutante:	
Fw_up_03d	5'-CGATCGAGCAGTCGCTGAC-3'
Rev_up_03d	5'-gtcagcaacaccttcttcacgaggCGACGATGAGACAAATAAGAAG-3'
Fw_dn_03d	5'-taatcagaattgggttaattggttgCAAGCCGCATGAGCGATGC-3'
Rev_dn_03d	5'-GAACATCACGGCGGTACCAA-3'
2148-Mutante:	
Fw_up_04d	5'-GCGCTTGTCTGCCCTCTC-3'
Rev_up_04d	5'-gtcagcaacaccttcttcacgaggCAGCATCGCTCATGCGGCT-3'
Fw_dn_04d	5'-taatcagaattgggttaattggttgACAACACCCGCTCAGCTAC-3'
Rev_dn_04d	5'-GTCCCACTTGATCGAGAACT-3'

Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe der *Pfu* Polymerase im Standard-PCR Programm (siehe oben). Die Produkte der flankierenden Sequenzen sowie der Kanamycin-Kassette werden als template einer zweiten PCR eingesetzt, fusioniert und mit Hilfe der äußeren Primer Fw_up_xx und Rev_dn_xx (siehe Abb. 36) vervielfältigt.

Ein Fusions-PCR Ansatz bestand aus:

Fusions-PCR-Ansatz:	Endkonzentrationen:
<i>Upstream</i> - Fragment	30 ng
<i>Downstream</i> -Fragment	30 ng
Kanamycin-Kassette	60 ng
Fw_up_xx Primer	30 pmol
Rev_dn_xx Primer	30 pmol
dNTPs	0,2 mM jeweils
10X PCR Puffer mit MgSO ₄	1X
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	1,2 U

Die Fusions-PCR wurde nach folgendem variierten Programm nach Sambrock *et al.* (1989) durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung: 2 min 94 °C
2. 8 x 3-Schritt-Zyklus: (Fusion)

Denaturierung	30 sec	94 °C
Hybridisierung	1 min	50 °C
Synthese	1 min	72 °C
3. 30 x 3-Schritt Zyklus:

Denaturierung	30 sec	94 °C
Hybridisierung	1 min	57 °C
Synthese	3 min	72 °C
4. Endsynthese 7 min 72 °C

Das entsprechende PCR Produkt der erwarteten Größe wurde nach Agarosegelelektrophorese durch Gelextraktion (GelExtraction Kit, Qiagen) gereinigt und direkt in *S. elongatus* Zellen transformiert (siehe unten).

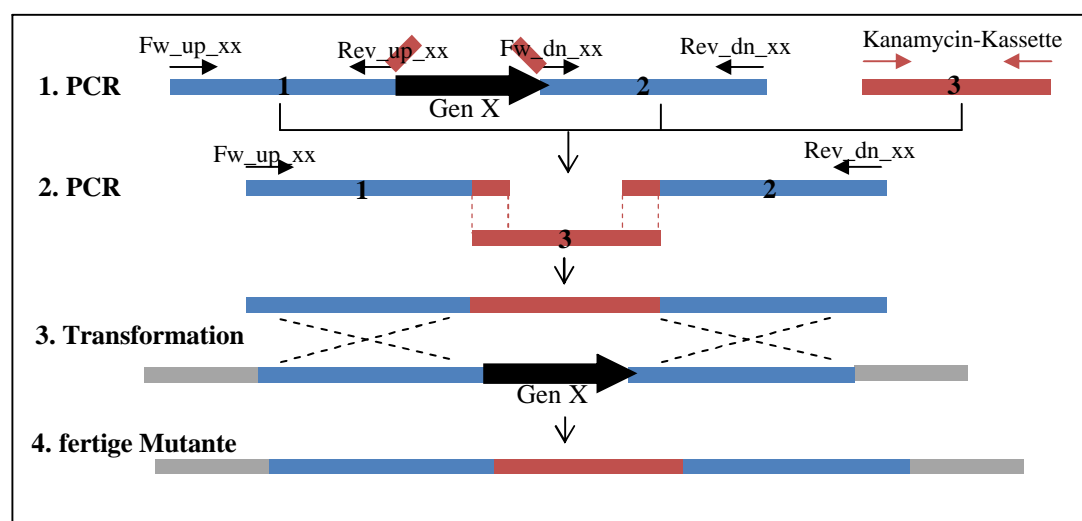


Abbildung 36 Klonierungsschema für Herstellung der Knockout Mutanten. Die geschlossenen Pfeile symbolisieren die jeweiligen Primer mit entsprechenden Namen (darüber).

2.4.6. Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration

Die DNA- bzw. RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Nukleinsäuren weisen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm auf. Bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht A_{260} von 1,0 einer Konzentration von ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Durch die zusätzliche Bestimmung der Absorption bei 280 nm lässt sich die Reinheit der Probe bestimmen. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung sollte ein Verhältnis A_{260}/A_{280} von 1,8 bis 2,0 ausweisen. Die Konzentration konnte auch mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese bestimmt werden. Hierfür wurden 1 - 3 µl Probe im Vergleich zu einem quantifizierten Größenstandard aufgetragen, gegen diesen die Konzentration abgeschätzt werden konnte.

2.4.7. Agarosegelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA mittels horizontaler Gelelektrophorese wurde je nach Größe der Fragmente 0,7 bis 1,5 %-ige Agarosegele in TAE-Puffer verwendet. Zur Probenvorbereitung wurde die DNA mit 1/6 ihres Volumens mit DNA-Auftragspuffer versetzt. Nach Einlaufen der Proben in das Agarosegel wurde die Elektrophorese bei konstanter Spannung von 80 V durchgeführt. Das Gel wurde nach erfolgter Elektrophorese für 10 min in einem Ethidiumbromidbad inkubiert. Während dieser Zeit lagerten sich die Ethidiumbromidmoleküle in die doppelsträngige DNA ein. Die DNA konnte dann durch UV-Licht sichtbar gemacht werden und wurde fotografisch festgehalten.

TAE-Puffer 10 x, pH 7,9

48,4 g	Tris
11,42ml	Eisessig
20 ml	EDTA, pH 8,0 [0,5 M]

2.4.8. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen gespalten. Bei einer analytischen Restriktion wurden in einem Volumen von 10 bis 15 µl mit 1 µg DNA, 2 bis 4 Einheiten der entsprechenden Restriktions-

endonukleasen sowie 1 bis 1,5 µl des vom Hersteller mitgelieferten 10 fach konzentrierten Reaktionspuffers durchgeführt. Die Ansätze wurden zwei Stunden bei entsprechender Arbeitstemperatur der Restriktionsendonuklease inkubiert, anschließend mit 6 x DNA-Auftragspuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und in einem Agarosegel elektrophoretisch analysiert.

Für präparative Ansätze, bei denen anschließend eine Ligation der DNA-Fragmente erfolgte, wurden in 40 µl 1 x Reaktionspuffer 3 – 5 µg DNA mit 5 Units Enzym gespalten. Nach vier bis acht Stunden Inkubation, bei der für das Enzym optimalen Temperatur, wurden die Fragmente durch präparative Gelelektrophorese getrennt, die Banden aus dem Gel ausgeschnitten und über das *QIAquick Gel Extraktions Kit* (Qiagen, Hilden) gereinigt.

2.4.9. Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte durch die T4 DNA-Ligase. Zunächst wurde mit je einem Aliquot der zu ligierenden Fragmente eine analytische Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Anhand dieser wurde das Konzentrationsverhältnis der beiden DNA-Lösungen abgeschätzt. Bei der Ligation lagen das zu klonierende Fragment (*Insert*) und der Vektor in einem molaren Verhältnis von etwa 3:1 vor. Die Gesamt-DNA-Menge im Ansatz betrug ca. 300 ng. Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 20 µl in 1x Ligationspuffer mit 1 U Ligase. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 1h oder bei 4 °C über Nacht. Die T4 DNA-Ligase wurde durch zehnminütige Erhitzung des Reaktionsmixes bei 65 °C inaktiviert. Dieser Ligationsansatz wurde direkt in der Transformation eingesetzt.

2.4.10. Transformation

2.4.10.1. Transformation von *S. elongatus* Zellen

Für die Transformation von *S. elongatus* Zellen wurde eine exponentiell wachsende Kultur einer OD₇₅₀ 0,4-0,6 wurde durch Zentrifugation (4.000 rpm, 5 min, RT) geerntet. Das Pellet wurde in BG11^N-Medium gewaschen und in 1 ml resuspendiert. Anschließend wurden 3 µg Plasmid-DNA oder 2 µg PCR-Produkt mit 100 µl der Zellsuspension versetzt und sofort mit 500 ml frischen BG11^N-Medium gemischt. Die Suspension wurde über

Nacht im indirekten schwachen Licht geschüttelt. Je 300 µl der Zellsuspension wurden auf mit Nitrocellulosefiltern (Millipore) belegten BG11^N-Platten ohne Antibiotika ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Filter auf mit entsprechenden Antibiotika versehenen BG11^N-Platten umgesetzt.

2.4.10.2. Transformation von *E. coli* Zellen

Für die Transformation wurden 4 µl des Ligationsansatzes mit 100 µl hitzekompetenter *E. coli* Zellen vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte bei 42 °C für 45 sec. Nach Abkühlen auf Eis wurde 800 µl LB-Flüssigmedium zugefügt und der Ansatz für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 75 bis 300 µl der Zellsuspension zur Selektion auf LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.4.11. Konstruktion des NbIR-Expressionsplasmids

Zur Überproduktion und Reinigung des NbIR Proteins wurde die kodierende Region in den pET15b Vektor (Novagen) kloniert. Der pET15b Vektor enthält einen T7/*lac* Promotor und fusioniert das Protein im N-terminalen Bereich mit einem 6x His-Epitop. Dies ermöglicht eine Affinitätsreinigung über Ni-NTA. Der *nbIR* Genomabschnitt (JGI ORF 2305) wurde mit Hilfe spezifischer Primer (siehe Tab. 19), die am jeweiligen 5' bzw. 3' Ende eine *NdeI* bzw. *BamHI* Schnittstelle enthielten, durch PCR amplifiziert. Die PCR Produkte wurden gereinigt, mit *NdeI* und *BamHI* nach Herstellerangaben restringiert (siehe oben) und in den ebenso geschnittenen Vektor nach Herstellerangaben ligiert. Nach der Transformation von *E. coli* XL1 Zellen wurden die Klone auf Ampicillin selektioniert. Die entstandenen Klone wurden auf das enthaltene Plasmid pET15b-NbIR durch Ganz-Zell-PCR und Sequenzierung kontrolliert.

Tabelle 19 verwendete Primer zur Herstellung des NbIR-Expressionsplasmides pET15b-NbIR. *NdeI* (forward) und *BamHI* (reverse) Schnittstellen sind unterstrichen.

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5'... 3'
For_NbIR-NdeI	5'-GGAATTCCATATGATCGCGCCAGCCTCGC-3'
Rev_NbIR-BamHI	5'-CGCGGATCCTTAGCTTTCGCGTAGGACATAAC-3'

2.4.12. Überexpression und Aufreinigung von rekombinanten NblR in *E. coli* BL21-Zellen

Rekombinantes NblR Protein aus *S. elongatus* wurde aus IPTG induzierten *E. coli*-BL21 (pET15b-NblR) Zellextrakten gewonnen. Die Durchführung erfolgte wie in Abschnitt A Material und Methoden beschrieben.

Die Effizienz der Aufreinigung wurde von ausgewählten Wasch- und Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE überprüft. Das Protein eluierte in zwei Maxima von der Säule. Diese wurden zusammen und auch getrennt gegen Lagerpuffer dialysiert. Die Endkonzentration der Proteinelösung wurde spektrometrisch aus der Absorption bei 280 nm und dem Extinktionskoeffizienten der Aminosäure-Zusammensetzung von NblR von $15930 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt. Der Extinktionskoeffizient von NblR wurde mit Hilfe der Aminosäuresequenz von NblR und des *ExpASy Proteomics Servers* ermittelt (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>). Das Protein wurde anschließend bei -20°C aufbewahrt.

Dialysepuffer:

20	mM	Tris-HCl, pH 7,4
50	mM	KCl
0,5	mM	EDTA
50	%	Glycerin

2.5. Analytische Methoden

2.5.1. Bestimmung der Lichtintensität

Zur Anzucht der Cyanobakterien wurde weißes Licht (Leuchtstoffröhrentyp Daylight, Basic Light, Farbe warmweiss; Osram) verwendet. Die photosynthetische Photonen-Flux-Dichte wurde mit einem Quantenmessgerät (Li-Core), das auf photosynthetisch aktives Licht geeicht ist, in micro-Einstein (μE) gemessen. Hier gilt:

1 μE	\approx	1 $\mu\text{mol Photonen} \times \text{sec}^{-1} \times \text{m}^{-2}$
19,5 μE	\approx	1000 Lux (bei $\lambda = 400\text{-}700$)

2.5.2. Bestimmung der Zelldichte

Das Wachstum der Bakterien wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte einer 1 ml Kulturprobe verfolgt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 750 nm (bei Cyanobakterien) bzw. bei einer Wellenlänge von 600 nm (bei *E. coli*) in einem Ultrospec 3000 Spektralphotometer (Amersham Pharmacia, Freiburg).

2.5.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Gesamtproteinkonzentration wurde mit Hilfe der *RotiQuant*®-Bradford-Reagenz (Roth) ermittelt. Durch Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue an ein Protein, wird dieser Farbstoff vom kationischen in den anionischen Zustand überführt. Die Absorption kann bei 595 nm gemessen werden. Die Absorptionsänderung ist über weite Bereiche zur Proteinkonzentration proportional. Für die Absorptionsmessungen wurden eine Eichgerade zu BSA im Bereich von 0,1 bis 2 mg/ml erstellt. Es wurden 1 - 5 µl Proteinlösung mit A.bidest auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Bradford-Reagenz (Roth) vermischt. Als Blindwert diente 800 µl A.bidest mit 200 µl Bradford-Reagenz. Nach ca. 5 min konnte eine konstante Extinktion bei 595 nm gemessen werden.

2.5.4. Pigmentanalyse in Cyanobakterien

Die Veränderung im Gehalt an Phycobilisomen und von Chlorophyll a der Cyanobakterien während Stickstoff- und Schwefelmangel wurden photometrisch in Ganz-Zell-Spektren nach einer modifizierten Methode nach Myers (1980) untersucht. Der Pigmentanteil wurde nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{PBS} = (1,0162 \times A_{631\text{korrigiert}}) - (0,12 \times A_{684\text{korrigiert}})$$

$$\text{Chla} = (1,0162 \times A_{684\text{korrigiert}}) - (0,063 \times A_{631\text{korrigiert}})$$

$$A_{\text{korrigiert}} = (A_{\text{gemessen}} - A_{\text{errechnet}})$$

$$A_{684\text{errechnet}} = 0,3666 \times (A_{570} - A_{750}) + A_{750}$$

$$A_{631\text{errechnet}} = 0,6555 \times (A_{570} - A_{750}) + A_{750}$$

2.5.5. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mit Hilfe der Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

2.5.5.1. Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970)

Für die eindimensionale elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde ein Tris/Glycin Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970) verwendet. Je nach zu untersuchender Proteingröße wurden unterschiedliche (12,5 oder 15 %) Polyacrylamidkonzentrationen mit 0,1 % SDS verwendet. Die Proben

wurden in 4 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und vor dem Gelauftrag 5 min bei 95 °C denaturiert. SDS denaturiert die Proteine, besonders nach vorheriger Reduktion mit DTT (Dithiothreitol), so dass sie ihre spezifische Quartär-, Tertiär- und zum Teil auch ihre Sekundärstruktur verlieren und eine mehr oder weniger einheitliche Form annehmen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 160 V in SDS-Laufpuffer. Nach der Auftrennung wurden die Proteinbanden durch Coomassie-Färbung oder Western Blot Analyse nachgewiesen.

Trenngel

375	mM	Tris-HCl, pH 8,9
12,5-15	%	Acrylamid 30%, 29:1
0,1	%	SDS
0,05	%	Ammoniumpersulfat (APS)
0,1	%	TEMED

Sammelgel

125	mM	Tris-HCl, pH 6,8
6	%	Acrylamid 30%, 29:1
0,1	%	SDS
0,05	%	APS
0,1	%	TEMED

SDS-Laufpuffer

25	mM	Tris
192	%	Glycin
0,1	%	SDS

1x SDS-Probenpuffer

50	mM	Tris-HCl, pH 6,8
100	mM	DTT
2	%	SDS
10	%	Glycerin
0,1	%	Bromphenolblau

2.5.5.2. Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Schägger und von Jagow

Für eine schärfere Auftrennung von kleinen Proteinen wurde ein 10%-iges Tris/Tricine Acrylamidgel nach Schägger und von Jagow (1987) verwendet. Dieses Gelsystem wurde für die 2.Dimension der 2D-Gelelektrophorese verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 mA für eine Stunde und anschließend bei 20 mA bis zum Ende des Gellaufes.

Acrylamid (49,5 % T, 3 % C)

480	g/l	Acrylamid
15	g/l	Bisacrylamid

in 900 ml lösen (evtl. leicht erwärmen)
auf 1l auffüllen, ca 1Eßl. Serdolite
1h rühren, durch Faltenfilter filtrieren

3 x Gelpuffer (pH 8,45)

3	M	Tris
0,3	%	SDS

Trenngel (1 Gel) 10 %

1,83	ml	Acrylamid
3	ml	3 x Gelpuffer
1,2	g	Glycerin
9	ml	ad. A.bidest

Sammelgel (1 Gel) 4 %

1	ml	Acrylamid 30 %, 29:1
2,5	ml	3x Gelpuffer
2	ml	Glycerin
2	ml	A.bidest

45 μ l 10 % APS
4,5 μ l TEMED

30 μ l 10 % APS
6 μ l TEMED

Laufpuffer:

Kathodenpuffer (pH 8,25)

0,1 M Tris
0,1 M Tricine
0,1 % SDS

Anodenpuffer

0,2 M Tris pH 8,9

2.5.5.3. Elektrophorese unter nativen Bedingungen

Für die Elektrophorese unter nativen Bedingungen werden alle Puffer ohne SDS verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TBE Puffer bei 60 - 100 V für ca. 2 Stunden. Die native PAGE wurde zur Auftrennung der DNA-Protein Komplexe der Gelretardierungsexperimente angewendet.

4 % Polyacrylamid

12,2 ml A.bidest
2 ml Acrylamid 30 % 29:1
375 μ l 10 x TBE
75 μ l 10 % APS
15 μ l TEMED

10 x TBE Puffer

890 mM Tris
890 mM Borsäure
20 mM EDTA, pH 8,3

2.5.6. Analytische 2D-Gelelektrophorese mit L-[S³⁵] Methionin markierten Proben

2.5.6.1. Herstellung der Proben und Probenaufbereitung

Zur Analyse der Unterschiede im Proteinsynthese-Muster durch 2D-Gelelektrophorese wurden Zellen von *S. elongatus* Wildtyp (Wt) und NblR-Mutante in BG11^N-Medium angezogen. Bei einer optischen Dichte (OD₇₅₀) von 0,7 wurden die Zellen aus einem Kulturvolumen von 100 ml in 50 ml Stickstoffmangelmedium oder zur Kontrolle in nährstoffgesättigtes Medium durch Filtration überführt (siehe oben). Davon wurde je 1 ml (0,5 OD₇₅₀) Aliquots in 25 ml Erlenmeyerkolben mit 5 μ Ci L-[S³⁵] Methionin für 1 h markiert. Nach Beendigung der Markierung durch Zugabe von 1 mM unmarkierten Methionin wurden 0,6 ml der Aliquots in ein Eppendorfcup überführt, in flüssigem Stickstoff für 5 s abgekühlt und die Zellen durch Zentrifugation bei 4 °C geerntet. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Zellen bei -20 °C eingefroren.

Zur Probenaufbereitung wurden die Zellpellets zweimal mit 600 µl eiskaltem 80 % (v/v) Aceton gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 100 µl Harnstofflysepuffer resuspendiert und die Zellen im Ribolyser aufgebrochen. Nach der Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 min und 4 °C wurde die Proteinkonzentration, wie in Abschnitt C 2.5.3. beschrieben, bestimmt. Je ein Volumen, das 2,5 µg Gesamtprotein entsprach, wurde in der 2D-Gelelektrophorese eingesetzt.

2.5.6.2. 2D-Gelelektrophorese

Bei dieser Technik werden die Proteine in zwei voneinander unabhängigen Schritten getrennt: in der 1. Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI), und in der 2. Dimension, einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE), nach ihrem Molekulargewicht (MW). Jeder Spot auf dem hierbei entstehenden Gel stellt ein bestimmtes Protein in der Probe dar. Es können Tausende von Proteinen getrennt und Informationen über ihren pI, ihr MW und ihre Menge in der Probe gewonnen werden.

1. Rehydrierung der IPG Streifen

Vor Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension wurden die IPG Streifen (Immobiline DryStrip pH 4-7, 7 cm, Amersham) in einer speziellen Wanne (Immobiline DryStrip Reswelling Tray) rehydriert. Hierfür wurden 140 µl Rehydrierungslösung mit der jeweiligen 2,5 µg Protein-Probe vermischt und in die Wanne gefüllt. Der IPG Streifen wurde vorsichtig mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei in den Puffer gelegt und mit 3 ml Mineralöl (DryFluid, Amersham) überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

2. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung ist eine elektrophoretische Methode, mit der Proteine aufgrund ihres isoelektrischen Punktes getrennt werden. Proteine sind Amphotere, d.h. ihre Nettoladung ist in Abhängigkeit des pH Wertes ihrer Umgebung positiv, negativ oder gleich Null. Der isoelektrische Punkt (pI) eines Proteins ist der spezifische pH-Wert, an dem seine Nettoladung Null beträgt. Die Anwesenheit eines pH-Gradienten ist Grundbedingung für die IEF-Technik. In einem pH-Gradienten, unter dem Einfluss eines

elektrischen Feldes, wird ein Protein zu seiner pI entsprechenden Position wandern, da das Protein dort die Nettoladung Null besitzt. Ein Protein mit einer positiven Nettoladung wird in Richtung der Kathode wandern, dabei nimmt seine positive Ladung mehr und mehr ab, bis es an der Stelle seines pI's angekommen ist. Das Gleiche gilt in umgekehrter Weise für negativ geladene Proteine. Durch diesen fokussierenden Effekt der IEF werden die Proteine an ihrem pI konzentriert.

Die IEF wurde in einem Multiphor II Flachbett Elektrophoresesystem (Amersham) durchgeführt. Die rehydrierten Streifen mit den Proteinen wurden kurz mit A.bidest abgespült und in die Streifenwanne gelegt, so dass sich die anodischen Streifenenden auf gleicher Höhe befanden. Durch feuchte Elektrodenstreifen (Saugpapier) wurden die Kathode bzw. Anode leitend verbunden, die Elektroden angeschlossen und die Gelstreifen mit Mineralöl (DryFluid, Amersham) überschichtet. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Temperatur von 20 °C unter folgenden Bedingungen im Gradientenmodus durchgeführt:

Tabelle 20 Programm für IEF am EPS 3501 XI Power supply im Gradienten Modus; current check off.

Phase	Spannung (V)	Stromstärke (mA)	Leistung (W)	Zeit (h:min)	Vh
1	200	2	5	0:01	1
2	3500	2	5	1:30	2800
3	3500	2	5	1:30	5200

3. Äquilibrieren der IPG Streifen

In der zweiten Dimension erfolgte nun die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe. Hierfür müssen diese mit SDS vorbereitet werden. Nach Beendigung der Fokussierung wurden die Gele mit der Gelseite nach unten in eine schmale Wanne gelegt und für 15 min bei 37 °C in Lösung 1 inkubiert. Die hohe Konzentration an DTT führt zur Reduktion der Proteine. Anschließend wurde die Wanne mit A.bidest gespült und die Gelstreifen für weitere 15 min und 37 °C in Lösung 2 äquilibriert. Hierbei verlieren die Proteine ihre spezifische Quartär-, Tertiär- und zum Teil auch ihre Sekundärstruktur. Nach Beendigung der Äquilibrierung wurden die Streifen kurz mit A.bidest gewaschen um eine Auskristallisierung des Harnstoffs zu verhindern. Für den Start der zweiten Dimension wurden die Streifen nun auf ein 10 % PAA Trenngel nach Schagger und von Jagow (siehe oben) mit 0,5 % Agarose in Kathodenpuffer eingebettet. Die

Elektrophorese erfolgte bei 10 mA für eine Stunde und anschließend bei 20 mA bis zum Ende des Gellaufes. Anschließend wurde das Gel mit Silbernitrat gefärbt, getrocknet und für mehrere Tage mit einem Phosphor Screen exponiert und mit dem PhosphorImager System bei 100 µm Auflösung eingelesen. Alternativ wurden die Gele mit Röntgenfilmen exponiert.

Harnstofflysepuffer

7 M Harnstoff
2 M Thioharnstoff
1 % Triton X-100
1 % DTT
0,02 % Pefablock

Rehydrierungslösung

7 M Harnstoff
2 M Thioharnstoff
0,5 % Triton X-100
0,2 % DTT

Äquibrierungs-Grundlösung:

50 mM Tris-HCl, pH 8,8
6 M Harnstoff
30 % Glycerin
3 % SDS

Lösung 1

+ 10 mg/ml DTT

Lösung 2

+ 25 mg/ml Iodacetamid

2.6. Chromatographische Methoden

Die folgenden Säulenchromatografien wurden an der *BioLogic Workstation* (Bio-Rad) bei 4 °C durchgeführt. Alle verwendeten Puffer wurden durch Filtration (Porengröße: 0,45 µm) von ungelösten Substanzen gereinigt und anschließend vollständig entgast. Verwendet wurde eine His-SelectTM-Säule (1ml Ni-NTA, Sigma) Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von nativen NblR und Superdex 200 10/300 GL (24 ml, GE Healthcare) zur Bestimmung des Molekulargewichtes.

2.6.1. Bestimmung des Molekulargewichtes

2.6.1.1. Eichung der Gelfiltrationssäule

Zuerst musste die Superdex 200 Säule (GE Healthcare) durch definierte Größenstandards geeicht werden. Die Säule wurde in Gelfiltrationspuffer äquilibriert und eine Flussrate von 0,5 ml min⁻¹ angelegt. In einem ersten Lauf wurde *Blue Dextran* auf die Säule aufgetragen, um das Ausschlussvolumen zu ermitteln. Im zweiten Lauf wurden Ovalbumin und die Carboanhydrase und im dritten Lauf wurden BSA und Cytochrom C

auf die Säule geladen. Die verwendeten Konzentrationen der Größenstandards sind in Tabelle 21 angegeben. Die Elutionsprofile wurden durch den *BioLogic Controller* (Bio-Rad) aufgenommen und verwaltet. Aus den angezeigten Peaks (Angabe des Elutionsvolumens und der Zeit) wurde eine Eichkurve erstellt. Die Volumenangaben wurden in Abhängigkeit zum jeweiligen Molekulargewicht aufgetragen.

Tabelle 21 Standardansätze zur Eichung der *Superdex 200*.

Die verwendeten Standards mit ihren Molekulargewichten und den eingesetzten Konzentrationen sind aufgelistet.

Standard	Eingesetzte Konzentration	Molekulargewicht [Da]
Blue Dextran	2 mg/ml	2.000.000
BSA Albumin	10 mg/ml	66.000
Ovalbumin	10 mg/ml	43.000
Carboanhydrase	3 mg/ml	29.000
Cytochrom C	2 mg/ml	12.400

Gelfiltrationspuffer

50 mM Na-Phosphat, pH 7,4

150 mM NaCl

2.6.1.2. Gelfiltration von Proteinen

Nach der Eichung der Gelfiltrationssäule wurde jeweils ein Aliquot der aufgereinigten und nativen Proteine auf die *Superdex 200* Gelfiltrationssäule aufgetragen und mit einer Flussrate von $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ eluiert. Zusätzlich wurden Fraktionen von jeweils 250 μl gesammelt um eine Dot Blot Analyse durchführen zu können. Aus den Angaben zum Elutionsprofil wurde das Elutionsvolumen errechnet. Mit Hilfe der vorher erstellten Eichgerade konnte das Molekulargewicht der untersuchten Proteine ermittelt werden.

2.7. Färbung von Polyacrylamidgelen

2.7.1. Coomassie-Färbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel für 20 min in 100 ml Fixierlösung inkubiert. Danach konnten die Proteine mit Coomassie blue G250 Färbelösung sichtbar gemacht werden. Der Farbstoff legt sich reversibel an die Aminogruppen der Proteine. Die Nachweisempfindlichkeit liegt bei dieser Färbemethode

bei 100 – 400 ng Protein. Während des Fixier- und Färbeporgangs wurde das Gel sanft geschüttelt (Polymax 1040, Heidolph Instruments). Anschließend wurde das Gel in Entfärberlösung gelagert, bis sich die Proteinbanden deutlich vom klaren Hintergrund abhoben.

Fixierer	Färbelösung	Entfärber
25 % Isopropanol	10 % Essigsäure	10 % Essigsäure
10 % Essigsäure	0,06 % Coomassie blue G250	

2.7.2. Silberfärbung nach Blum (1987)

Der Vorteil der Silberfärbung liegt in ihrer hohen Empfindlichkeit 5 - 30 ng Protein. Der Nachteil liegt in der Dauer und der schwierigeren Reproduzierbarkeit und der fehlenden Quantifizierbarkeit, da verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität färben. Die Silberfärbung ist außerdem nicht spezifisch für Proteine, sondern färbt auch Nukleinsäuren, Lipopolysaccharide, Lipide und Glykolipide. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die Proteine im Gel durch Inkubation von mindestens einer Stunde in Fixierlösung festgehalten. Nach dreimaligem Waschen in 50 % Ethanol erfolgte die Vorbehandlung des Gels in 0,02 % Natrium-Thiosulfat für 1 min. Die Silberionen können erst dann optimal in das Gel eindringen, um sich an die Proteine zu lagern. Durch dreimaliges Waschen mit A.bidest wurde das Natrium-Thiosulfat gut entfernt. Das Gel wurde anschließend für 20 min in Silbernitratlösung imprägniert. Hierbei können die Silberionen mit Glutamat-, Aspartat-, und Cysteinresten der Proteine Komplexe bilden. Durch wiederholtes Waschen mit A.bidest wurden alle freien Silberionen entfernt. Durch die Entwicklerlösung (alkalisches Formaldehyd) reduzieren sich die Silberionen zu elementarem Silber, das die Proteine im Gel schwarz färbt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Stopp-Lösung (pH Änderung durch Essigsäure) beendet.

Fixierer	Entwickler
50 % Ethanol	6 % NaCO ₃
12 % Essigsäure	0,5 ml/l Formaldehyd (37%)
0,5 ml/l Formaldehyd (37 %)	0,008 % Natriumthiosulfat
Vorbehandlung	Stopplösung
0,02 % Natriumthiosulfat	50 % Ethanol
	12 % Essigsäure

Imprägnierlösung

0,2 % NaNO₃

0,75 ml/l Formaldehyd (37 %)

2.8. Immunologische Methoden

Es wurden für die immunologischen Methoden Kaninchen-AntiNblR-Antiserum (α -NblR) Antikörper des 90. Immunisierungstages in einer Verdünnung von 1:10.000 verwendet. Die Herstellung der Antiseren erfolgte durch den Antikörper-Service Dr. J. Pineda (Berlin) mit Hilfe des aufgereinigten NblR (700 μ g, diese Arbeit). Als sekundärer Antikörper wurde *POD- α -Anti-Rabbit IgG*-Antikörper Peroxidase Konjugat (Sigma) verwendet. Der PsbA (D1) Antikörper (1:5000) wurde von der Firma AgriSera (Schweden) bezogen. Als sekundärer Antikörper wurde Rabbit anti-chicken IgY-Antikörper (AgriSera, Schweden) verwendet.

2.8.1. Immunoblotanalyse

Zum immunspezifischen Nachweis von Proteinen wurden Proteingemische im Anschluss an eine Elektrophorese mit Hilfe der „Semidry“-Blotting-Apparatur (Fa. Hölzel) auf eine Nitrocellulosemembran (BioTraceTMNT, 0,45 μ m, PALL) transferiert. Vor dem Transfer wurde die Membran für 5 min in H₂O (bidest) eingeweicht. Verschiedene Blottingpapiere (Gelblotting-Papier, Schleicher & Schuell) wurden kurz in Western-Blot-Puffer inkubiert. Der Blot wurde wie nachfolgend beschrieben aufgebaut. Für die Anode ein dickes Blottingpapier in Anodenpuffer I sowie ein dünnes Blottingpapier in Anodenpuffer II, darauf folgend die Nitrocellulosemembran und das Polyacrylamidgel. Die Kathode bestand aus einer dünnen und einer dicken Lage Blottingpapier in Kathodenpuffer. Der Proteintransfer erfolgte für 30 min bei einer konstanten Spannung von 20 V.

Vor der Reaktion des Blots mit Antikörpern wurden die restlichen Proteinbindestellen der Blotmembran mit einer 10 %-ige Milch-TBS-Lösung abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (1:10.000) erfolgte in einer 1%-iger Milch-TBS-Lösung für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht. Die folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Nach dem Entfernen aller ungebundene Antikörper mit TBS (3x 30 s) wurde die Membran in 1 %-iger Milch-TBS

Lösung mit dem sekundären Antikörper (1:10.000) für mindestens 45 min auf einem Taumelschüttler (Polymax 1040, Heidolph Instruments) inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal mit TBS und zweimal mit A.bidest gewaschen, um alle unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe einer chemilumineszierenden Reaktion. Hierfür wurde die Membran für eine Minute in einen Mix aus 880 µl „Lumi Light Western Blotting Substrate“ und 120 µl „Lumi Light^{PLUS} Western Blotting Substrate“ (beides Roche, Mannheim) überführt, danach in eine Folie eingeschlagen und in eine Filmkassette überführt. Auf die Membran wurde ein Röntgenfilm (CEA RP New, Röntgen Bender, Karlsruhe) aufgelegt, der nach zwei bis 60 min Exposition entwickelt wurde.

Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase (POD) reduziert Wasserstoffperoxid. Die dabei entstehenden Oxidationen oxidieren Luminol, was zur Entstehung von Photonen führt, welche wiederum den Röntgenfilm belichten.

TBS

20 mM Tris-HCl, pH 7,4
0,5 % NaCl

Anodenpuffer I

300 mM Tris
20 % Methanol

Anodenpuffer II

25 mM Tris
20 % Methanol

Kathodenpuffer

25 mM Tris
20 % Methanol
40 mM ε-Amino-n-Caprinsäure

2.8.2. Dot Blot Analyse

Bei der Dot Blot Methode wurden 5 bis 10 µl der zu untersuchenden Proben direkt auf eine Nitrocellulosemembran getropft. Nach vollständigem Trocknen der Membran wurde sie zur Absättigung für 30 min in 10 %-igem Milch-TBS Puffer eingelegt. Der primäre Antikörper wurde in einer 1:10.000 fachen Verdünnung in 1 %-iger Milch-TBS Lösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 30 s) mit TBS wurde die Nitrocellulosemembran erneut in frische 1 %-ige Milch-TBS Lösung mit sekundärem Antikörper (1:10.000) überführt. Die Inkubation erfolgte für mindestens 45 min bei Raumtemperatur unter leichten Schwenken. Nach dreimaligem Waschen mit TBS und zweimaligem Waschen mit A. bidest wurde die Membran wie oben beschrieben entwickelt.

2.9. Northern Blot Analyse

2.9.1. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Fragmente für *psbAI* (195 bp), *psbAIII* (118 bp), *cpcB* (319 bp) und *nsi5* (192 bp) wurden mit Hilfe der PCR aus genomischer *S. elongatus* DNA mit den spezifischen Oligonukleotiden (siehe Tab. 22) amplifiziert. Die radioaktive Markierung erfolgte mit dem *5'End Labeling Kit* (Amersham) mit 20 μCi [γ - ^{32}P]ATP nach Herstellerangaben. Nach der Inkubation für 30 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 μl STE-Puffer beendet.

Reaktionsansatz:

200 ng	DNA
20 μCi	[γ - ^{32}P] ATP
1 U	T4 Polynukleotid Kinase (PNK)
1 X	PNK-Puffer

STE-Puffer (pH 7,5)

100 mM	NaCl
20 mM	Tris-HCl
10 mM	EDTA

Die DNA-Fragmente wurden anschließend über *ProbQuantTM G-50 Micro Columns* (Amersham) aufgereinigt und nicht eingebaute Nucleotide entfernt. Die Effizienz der Markierung wurde in einem Szintillationszähler durch Messen der radioaktiven Strahlung überprüft.

Tabelle 22 Name und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide für die Amplifikation der DNA-Fragmente für die Sonden des Northern Blots

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5'... 3'
5'psbAI	5'-GAC AGT AGT TTT GGC TCC GTT-3'
3'psbAI	5'-CTT GAG GTT GTA AAG GGC AAG-3'
5'psbA3	5'-ATT GTT GGG GCG ATC GCC AA-3'
3'psbA3	5'-TTG AGT CCA GTG AAT TTT TAT GTA-3'
5'cpcB	5'-AAA GTC GAG AAC AGG AGA CTG-3'
3'cpcB	5'-ACC GCG TAG GTC ACG TAG C-3'
5'nsi5	5'-AGT TGG GTG ATG CAG CCT T-3'
3'nsi5	5'-GAT CAG ATC CAT CGC ATC CA-3'

2.9.2. RNA-Isolierung und Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse der Genexpression verschiedener Gene im Vergleich Wt und NblR-Mutante unter Stickstoffmangel wurde eine Northern Blot Analyse durchgeführt. *S. elongatus* Zellen des Wt und der NblR-Mutante wurden in BG11^N-Medium angezogen. Bei einer optischen Dichte (OD₇₅₀) von 0,7 wurden die Zellen in 100 ml Stickstoffmangelmedium oder zur Kontrolle in nährstoffgesättigtes Medium durch Filtration überführt (siehe

oben). Zwölf, 24 bzw. 48 h nach Induktion des Nährstoffmangels wurden Proben zur RNA-Isolierung genommen (siehe oben). Die RNA-Isolierung wurde nach dem modifizierten Protokoll nach Roche (siehe oben) durchgeführt.

Die für die Northern-Hybridisierung benötigte Auftrennung der Gesamt-RNA erfolgte in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel. Die native RNA bildet Sekundärstrukturen die eine Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht sonst verhindert. Hierfür wurden je 6 µg RNA (in 10 µl) in Ladepuffer (30 µl) aufgenommen, für 10 min bei 65 °C denaturiert und anschließend auf ein 1,3 %-iges Formaldehyd-Agarosegel geladen. Die Elektrophorese wurde bei 150 V in 1x MOPS Puffer durchgeführt, bis die blaue Lauffront (Bromphenolblau in einer freien Spur) maximal 2/3 des Gels durchlaufen hatte.

10 x MOPS

0,2 M MOPS, pH 7
0,05 M NaOAc
0,01 M EDTA

Ladepuffer

2 ml Formamid
1 X MOPS
150 µl/ml Formaldehyd (37 %)
1 µg/ml Ethidiumbromid

1,3 % Formaldehyd-Agarosegel:

1,3 g Agarose in 73 ml H₂O DEPC und 10 ml 10 x MOPS auflösen und aufkochen
Der auf 60 °C abgekühlten Agarose unter dem Abzug 17 ml Formaldehyd (37 %) zusetzen, kurz aufrühren und Gel sofort gießen.

2.9.3. Northerntransfer

Die Northern-Blots wurden nach einem modifizierten Protokoll nach Sambrock *et al.* (1989) durchgeführt. Nach dem Beenden des Gellaufes wurde das Gel auf einem Transilluminator fotografiert. Vor dem Vakuum-Blot wurde das Gel für 10 min in DEPC-versetztem Wasser, für 30 min in 50 mM NaOH und anschließend für 30 min in 0,1 M Tris-HCl (pH 7,0) gewaschen. Der Northerntransfer wurde über eine Vakuum-Blotting-Apparatur nach Herstellerangaben (Biometra) auf eine positiv geladene Nylonmembran durchgeführt. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut: auf die Auffangwanne mit der porösen Filterplatte wurden zwei in Transferpuffer getränkte Whatman Filterpapiere gelegt. Auf die auf Gelgröße zugeschnittene Nylonmembran wurde die ebenfalls mit Transferpuffer befeuchtete Gummimatte platziert. Das Agarosegel lag auf jeder Längsseite ca. 5 mm auf der Gummimatte auf, um ein Vakuum zu garantieren. Der Transfer der RNA auf die Nylonmembran erfolgte nach Anlegen des Vakuums von 100 mbar für 2,5 h. Während dieser Zeit wurde das Gel stets mit Transferpuffer bedeckt.

NaOH im Transferpuffer erhöht die Effizienz des Blottens. Das Ergebnis des Transfers wurde nach Beendigung des Blottens auf einem Transilluminator überprüft. Die Membran wurde in Frischhaltefolie gepackt und die RNA für 5 min auf einem Transilluminator fixiert.

2.9.4. Hybridisierung

Die Membran wurde nach RNA-Fixierung mit 2 x SSC befeuchtet, in Hybridisierungsröhrchen überführt und mit 7 ml Hybridisierungslösung (Biologic Industries, Israel) für ca. 2 h bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde die [³²-P] markierte Sonde (siehe oben) für 10 min bei 95 °C denaturiert und sofort zur Hybridisierungslösung gegeben. Die Membran wurde bei 65 °C im Hybridisierungssofen über Nacht inkubiert. Im Anschluss an die Hybridisierung wurde die Membran für jeweils 20 min in 2 x SSC, und zweimal 0,1 x SSC bei 65 °C gewaschen, danach vorsichtig aus dem Hybridisierungsröhrchen genommen, in Klarsichtfolie verschweißt und für 1 - 3 Tage mit einem Phosphor Screen exponiert und mit dem PhosphorImager System bei 100 µm Auflösung eingelesen. Alternativ wurde die Membran mit einem Röntgenfilm exponiert.

Transferpuffer
100 mM NaOH

20 x SSC
0,3 M Na-Citrat, pH 7,0
3 M NaCl

2.10. Protein-DNA-Interaktionsstudien

Zur Untersuchung der möglichen DNA-Bindeeeigenschaft von NblR zu Promotorregionen der in der Mutante deregulierten Gene wurden Protein-DNA-Interaktionsstudien durchgeführt.

2.10.1. Gel-Retardierungs-Analyse

Durch die Bindung eines Proteins an DNA verändert sich das Laufverhalten in einem nativen Polyacrylamidgel. Die verwendeten DNA-Fragmente werden hierfür radioaktiv markiert. Die DNA-Fragmente für die Promotorregion *glnA* (158 bp), *nblA* (206 bp), *nsi5* (214 bp) sowie einer verkürzten Region von *nsi5* (196 bp) wurden durch PCR aus genomischer *S. elongatus* DNA mit spezifischen Oligonukleotiden (siehe Tab. 23) hergestellt. Die Synthese des *glnA*-Promotorbereichs, die radioaktive Markierung der

DNA-Fragmente sowie der Gel-Retardierungsansatz erfolgte wie in Abschnitt A Material und Methoden beschrieben.

Tabelle 23 Name und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide für die Amplifikation der DNA-Fragmente für die Gel-Retardierungs-Analyse

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5' ... 3'
5'-nblA-Prom	5'-GGC GCT GCC TGG GAA AGT C-3'
3'-nblA-Prom	5'-GGG AGC CTC CGG CAC TGC-3'
for_glnA7942-6	5'-CAC AAC CAG GAA CTG AAG AC-3'
rev_glnA7942-5	5'-CGC CTG CAA GAT TTC GTT AC-3'
for_nsi5-Prom	5'-TCG CGG TCA ACT AGG TAA AAC A-3'
rev_nsi5-Prom	5'-ATC TGC AAT TAG AAC GGT GGC T-3'
rev-nsi5_Pr1 (verkürzt)	5'-GGC TGC TGG TGT AAA CAG CTA-3'

2.10.2. Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse (Biacore)

Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse (SPR) wurde, wie in Abschnitt A Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Die biotinylierte DNA für den *nsi5* Promotorbereich wurde mit den Oligonukleotiden rev-nsi5-Prom und for-nsi5pr-biot (siehe Tab. 5, Abschnitt B), die DNA für den *nblA* Promotorbereich wurde mit den Oligonukleotiden 5'nblA-Prom und 3'rev-nblapr-biot (siehe Tab. 3, Abschnitt A) aus genomischer *S. elongatus* DNA durch PCR hergestellt und die Bindung von NblR mit und ohne Effektormoleküle überprüft.

2.11. Chlorophyll Fluoreszenz-Messungen mit Hilfe eines PAM-Fluorometers

2.11.1. Chlorophyll-Fluoreszenz als Indikator photosynthetischer

Reaktionen

Die Photosynthese ist eine photochemische Reaktion die Lichtenergie in chemische Energie umwandelt. Die Chlorophyll-Moleküle sind durch Absorption von roten und blauen Lichtquanten in der Lage verschiedene Anregungszustände anzunehmen. Die so aufgenommene Anregungsenergie kann auf unterschiedliche Art wieder abgegeben oder genutzt werden (siehe Abb. 37). Das Fluoreszenzspektrum (siehe Abb. 37, links) besitzt nach Anregung blauer bzw. roter Strahlung ein identisches Maximum im roten Spektralbereich.

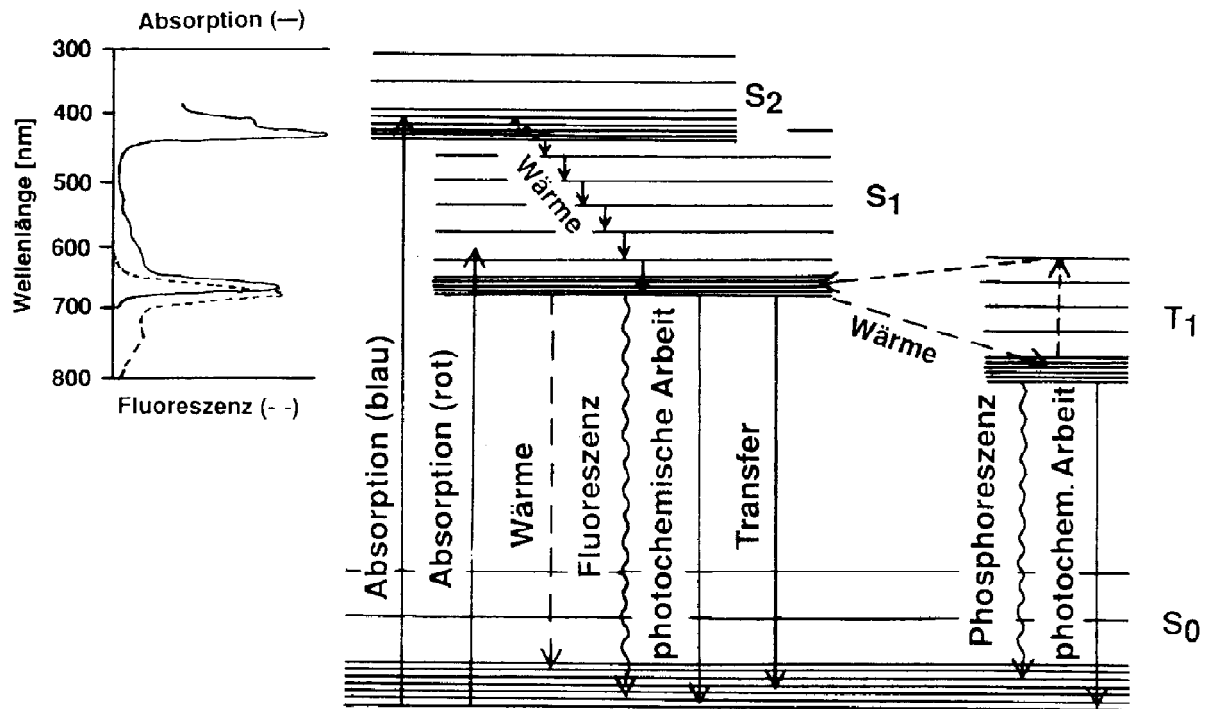


Abbildung 37 Absorptions- und Emissionsspektrum und die Zuordnung zu den unterschiedlichen Energieniveaus im Chlorophyll a Molekül. Abbildung aus (Schopfer *et al.*, 1999)

Die Absorption von Quanten aus dem roten oder blauen Spektralbereich bewirkt die Anregung von Elektronen aus dem Grundzustand S_0 in einen energetisch höheren S_1 oder S_2 Zustand. In dem oben gezeigten Schema sind auch die möglichen Wege der Energiedissipation, der Abgabe der Anregungsenergie gezeigt. Neben dem strahlungsfreien Übergang von S_1 auf S_0 ist auch ein Energietransfer auf ein anderes im Grundzustand befindliches Nachbarmolekül durch Resonanz möglich. Als Fluoreszenz wird die Abgabe elektromagnetischer Strahlung beim Übergang eines angeregten Elektrons vom S_1 in ein Niveau des S_0 Zustandes bezeichnet. Ein Teil der Anregungsenergie geht dabei als Wärme verloren. Der größte Teil der Fluoreszenzemission erfolgt über photochemische Reaktionen. Dabei wird durch die Rückkehr in den Grundzustand die abgegebene Energie über den photosynthetischen Elektronentransport für chemische Arbeit genutzt.

Wenn sich alle Reaktionszentren in offenem Zustand befinden ist die Fluoreszenz minimal (F_0 = Grundfluoreszenz). Das Chinon Q_A und somit die gesamte Elektronentransportkette liegt in oxidiertem Zustand vor. Ist Q_A jedoch vollständig reduziert, kann das Photosystem kein weiteres Elektron abgeben. Die Reaktionszentren sind nun geschlossen und die Fluoreszenz ist maximal (F_m).

2.11.2. Das Messprinzip des Pulse-Amplituden-Modulation (PAM)-Fluorometers

An einem PAM-Fluorometer ist das Anregungs- und Messlicht getrennt (siehe Abb. 38). Dieser Anordnung ermöglicht eine Variation der Lichtintensität des Dauerlichts während einer Messung. Das Messlicht ist zur Unterscheidung vom Anregungslicht (= aktinisches Licht, Dauerlicht) gepulst. Ein an den Detektor angeschlossener Verstärker ist auf die Frequenz der Messlichtpulse geeicht und verstärkt daher selektiv die gepulste Fluoreszenz, nicht aber die des aktinischen Lichtes. Die Fluoreszenz der zu untersuchenden Probe wird durch Pulse amplitudenmodulierten Schwachlichts einer lichtemittierenden Diode (LED) mit einer Peak-Emission von 655 nm angeregt. Des Weiteren existiert eine zusätzliche Lichtquelle (Blitzlampe) mit der sättigende Lichtblitze auf die Probe gegeben werden können. Dadurch schließen sich für kurze Zeit alle Photosysteme. Ein zusätzliches Filtersystem verhindert die Detektion von störendem Licht.

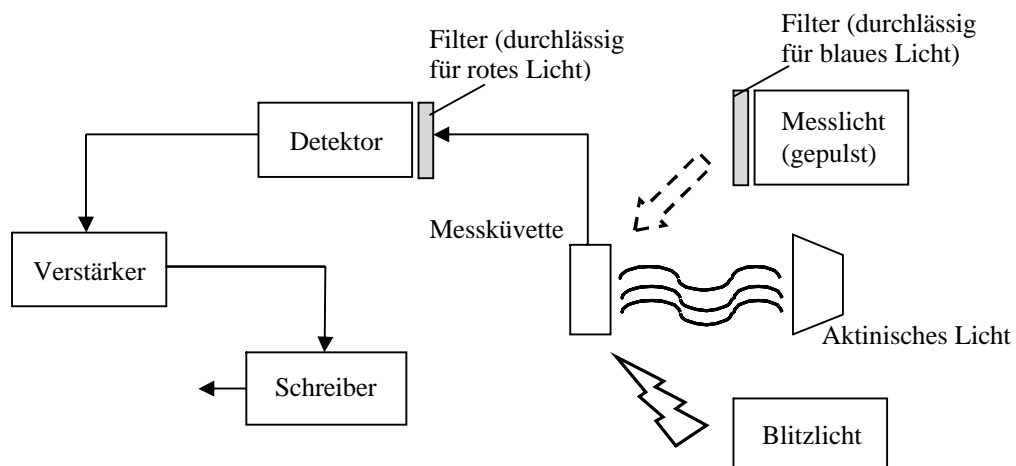


Abbildung 38 Schema des prinzipiellen Aufbaus eines PAM-Fluorometers

Eine 1:10 Verdünnung der zu messenden Suspension wurden in die Messkuvette gefüllt und das Verhalten der Fluoreszenz in Abhängigkeit der eingestellten Bedingungen über die *WinControl* (Walz, Effeltrich) aufgenommen. Die Messungen erfolgten an intakten, dunkeladaptierten Zellen, direkt im Nährmedium bei einer Grundfluoreszenz (F_0) im Dunkeln von 400-500 mV. Während der Bestrahlung mit Messlicht wurde ein Blitzlichtpuls (Sättigungspuls) gegeben, um die maximale Fluoreszenzrate (F_m) zu bestimmen. Anschließend wurde bei unterschiedlichen Fluenzraten (55, 67, 1127 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) des aktinischen Lichtes Sättigungspulse gegeben, um die maximale Fluoreszenzausbeute (F_m') zu bestimmen. Aus den ermittelten Werten für F_m (F_m') und F_0 (F_0') lässt sich die maximale variable Fluoreszenz F_v bestimmen.

$$F_v = F_m - F_0$$

Des Weiteren kann die effektive Gesamtquantenausbeute („Yield“) der photochemischen Energieumwandlung durch folgende Beziehung beschrieben werden:

$$\text{Yield} = (F_m' - F_0') : F_m'$$

F_m' ist die maximale Fluoreszenzausbeute, die mit einem Sättigungspuls mit einer vorher belichteten Probe erreicht wird. In den grünen Kulturen von Cyanobakterien ist F_m' generell kleiner als F_m , das nach vorheriger Dunkeladaptation bestimmt wird. Der Parameter F_0' ist die gemessene Fluoreszenzausbeute zu jeder gegebenen Zeit.

Bei der Anwendung der Sättigungspulsmethode wurde ebenfalls die apparente photosynthetische Elektronentransportrate (ETR) in $\mu\text{mol Elektronen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ berechnet. Dies erfolgte nach der Gleichung:

$$\text{ETR} = \text{Yield} \times \text{PAR} \times 0,5 \times 0,84$$

Der Transport eines Elektrons erfordert die Absorption zweier Quanten, da zwei Photosysteme beteiligt sind (Faktor 0,5). 84 % der einfallenden Quanten werden vom Photosystem absorbiert (Faktor 0,84).

2.12. Mikroskopie von Cyanobakterien

Zur Untersuchung der Lebensfähigkeit von *S. elongatus* Zellen während Stickstoff- bzw. Schwefelmangels wurden die Zellen mit LIVE/DEAD® BacLight Assay (MoBiTec, Göttingen) gefärbt und anschließend mikroskopiert. Hierbei werden die Zellen mit zwei verschiedenen Nukleinsäure-Färbungen inkubiert. SYTO 9 färbt dabei alle Bakterienzellen grün-fluoreszent, während Propidiumiodid nur in Bakterienzellen mit geschädigter Membran (ohne Membranpotential) eindringen kann. Diese Zellen erscheinen dadurch rot-fluoreszent, da der grüne Farbstoff überdeckt wird. Für den Ansatz wurden 0,3 μl Lösung A mit 0,3 μl Lösung B in 0,6 μl A.bidest gemischt. Zu jeweils 100 μl Zellsuspension wurden 0,2 μl Färbelösung zugegeben und der Ansatz für 15 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 15 μl auf einen mit 1,5 % Agarose beschichteten Objektträger getropft und in 1000 facher Vergrößerung mit einem Filter (B-2A; EX450-490) mikroskopiert und fotografiert. Lebende Zellen erscheinen dabei grün und die toten Zellen rot.

3. Ergebnisse

3.1. Physiologische Charakterisierung der *S. elongatus* NblR-Mutante

Durch ein Screening von chemisch mutagenisierten *pacL* (Ca^{2+} -abhängige ATPase) Mutanten auf Wachstumsdefekte in Gegenwart von 20 mM Ca^{2+} wurde zufällig die *nonbleaching* Mutante identifiziert, die als NblR (non-bleaching regulatory) bezeichnet wurde (Schwarz & Grossman, 1998). Diese Mutante wies einen *nonbleaching* Phänotyp sowie eine verringerte Überlebensfähigkeit bei Nährstoffmangel und Starklicht-Exposition auf. Darüber hinaus war die Expression des *nblA* Genes, das für die Initiation des Phycobilisomen-Abbaus verantwortlich ist, verringert (Luque *et al.*, 2001; Schwarz & Grossman, 1998).

Eine genauere phänotypische Charakterisierung sollte die verringerte Überlebensfähigkeit während den Stressbedingungen genauer analysieren und einen Hinweis auf die Funktion des *nblR* Genes in der Stress-Anpassung liefern.

3.2. Phänotypische Charakterisierung der *S. elongatus* Zellen unter Stickstoffmangel (Chlorose)

S. elongatus Wildtyp-Zellen sind als nicht-diazotrophe Cyanobakterien nicht in der Lage molekularen Stickstoff (N_2) zu fixieren. Ein Mangel an gebundenem Stickstoff führt in diesen Zellen zu einem Prozess, der als Chlorose oder *bleaching* beschrieben ist. Dieser Differenzierungsprozess geht mit dem Abbau der Phycobilisomen einher, wodurch die bläulich-grüne Farbe der Wildtyp-Kultur nach gelb übergeht (siehe Abb. 39). Die Kultur der NblR-Mutante blieb trotz Induktion des Stickstoffmangels aufgrund einer gestörten PBS-Proteolyse grün. Mit zunehmender Dauer des Stickstoff-Hungers konnte in dieser Mutante eine Aufhellung der Kultur beobachtet werden (siehe Abb. 39).

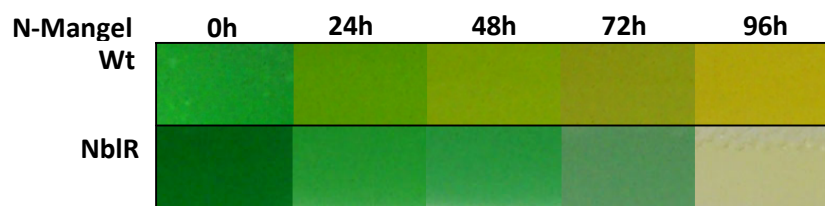


Abbildung 39 *S. elongatus* Wt und NblR Flüssigkulturen in verschiedenen Stadien der Chlorose. Die Kulturen wurden von stickstoffhaltigen auf stickstofffreies Medium überführt, unter Standardbedingungen inkubiert und zu Beginn sowie nach 24h, 48h, 72h und 96h des Stickstoffmangels fotografiert. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt der fotografierten Kultur.

Durch Ganz-Zell-Spektren kann die Pigmentzusammensetzung im Verlauf der Stickstoff-Chlorose verfolgt werden (siehe Abb. 40). Die Spektren von Wildtyp und NblR-Mutante zeigten die typischen Absorptionsmaxima von Chlorophyll a bei 440 nm und 680 nm, ein Maximum der Carotinoide bei 500 nm, sowie der akzessorischen Pigmente von Phycocyanin und Allophycocyanin bei 630 nm. Die Spektren der Wildtyp-Zellen zeigten eine graduelle Abnahme der Chlorophyll a und Phycobilisomen Absorption im Verlauf der Stickstoff-Chlorose (siehe Abb. 40). Nach 24-stündigem Mangel war die Menge an Phycobilisomen im Wildtyp um 60 % reduziert (bestimmt nach Myers, 1980, siehe Material und Methoden). Der Abbau von Chlorophyll a verlief im Wildtyp deutlich langsamer, denn nach 24 h ohne gebundenen Stickstoff waren noch 70 % des Ursprungsgehaltes vorhanden. Das Wildtyp-Spektrum 24 h nach Initiation des Mangels zeigte deutlich die Reduktion der Pigmente während des Chloroseprozesses und der nun größere Anteil an Chlorophyll a und Carotinoiden im Verhältnis zu den PBS veränderte die Farbe der Kultur zu gelb-grün (siehe Abb. 39).

Das Spektrum der NblR-Mutante wies hingegen eine Abflachung der Gesamt-Absorption auf (siehe Abb. 40), was gegen eine geordnete Reduktion der Pigmente und auf ein Absterben der Zellen hindeutet. Nach 24 h Stickstoff-Chlorose war die Menge an Phycobilisomen, sowie Chlorophyll a in den Zellen der NblR-Mutante nur um 30 % reduziert. Dadurch blieb die grün-blaue Färbung der Kultur erhalten (siehe Abb. 39). Mit zunehmender Dauer des Stickstoffentzugs und vermehrten Abbau des Chlorophyll a im Wildtyp erschien die Kultur durch die Carotinoide stärker gelb. Die Kultur der NblR Mutante hingegen blieb vollständig aus (siehe Abb. 39).

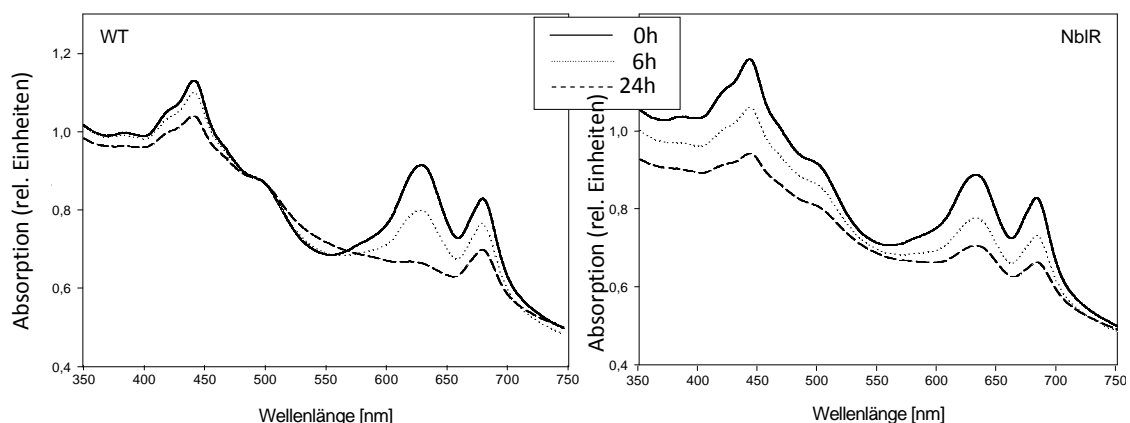


Abbildung 40 Absorptionsspektren von *S. elongatus*-Zellen nach Initiation eines Stickstoffmangels. Von Wildtyp- (links) und NblR- (rechts) Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Stickstoffentzug Ganz-Zell-Spektren im Spektralphotometer von 350 nm bis 750 nm erstellt. Die Absorptionen wurden auf 750 nm normiert.

In der ersten Phase der Chlorose verdoppelt sich die Zellzahl noch einmal, wobei die vorhandenen Pigmente gleichmäßig auf die Tochterzellen aufgeteilt werden. Während der Wildtyp und die NblR-Mutante unter stickstoffreichen Bedingungen keinen Unterschied im Wachstum aufwiesen, änderte sich dies nach Initiation des Stickstoffmangels. In Abbildung 41 ist die Zelldichte ($OD_{750}/1\text{ml}$) nach Stickstoffentzug dargestellt. Die Zellzahl der NblR-Mutante verdoppelte sich innerhalb von 22 Stunden. Dies entspricht der Verdopplungszeit von Mutante und Wildtyp unter optimalen Bedingungen. Die Wachstumsrate des Wildtyps verlangsamte sich nach Stickstoffentzug deutlich. Die Wildtyp Kultur erreichte erst nach 26 Stunden eine Verdopplung der Zellzahl und blieb stets unter der Gesamtzellzahl der Mutante. Nach einmaliger Verdopplung der Zellzahl nach Stickstoffentzug kam es bei keiner der beiden Kulturen zu einer weiteren Zunahme der Zellzahl.

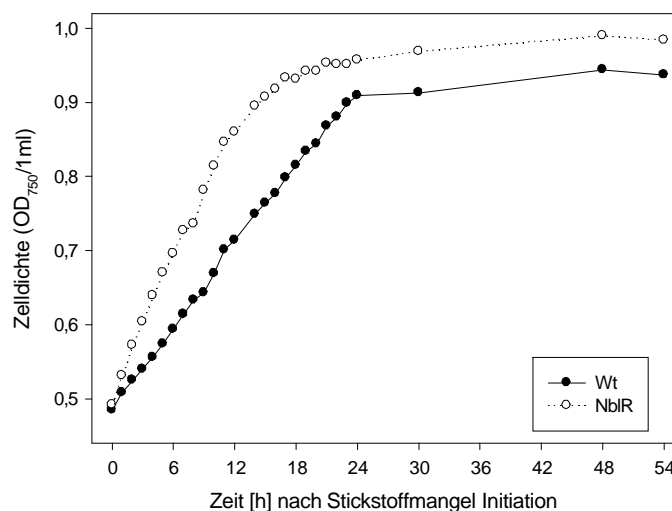


Abbildung 41 Wachstum der *S. elongatus*-Kulturen nach Stickstoffentzug. Wildtyp (geschlossene Kreise) und NblR Mutante (offene Kreise) wurde auf eine OD_{750} von 0,49 in den auf Stickstoffmangel überführt und unter Standardbedingungen weiter kultiviert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis.

In *S. elongatus* Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass während der Chlorose die PS II Aktivität verringert wird und bis zu einer Restaktivität von 0,1 % sinkt. Der Erhalt der photosynthetischen Restaktivität ist für den Erhalt der Lebensfähigkeit der Zellen essenziell (Görl *et al.*, 1998; Sauer *et al.*, 2001).

Zur Bestimmung der PS II Aktivität von Wildtyp- und NblR-Zellen vor und nach Stickstoff-Entzug wurden zu verschiedenen Chlorose-Zeitpunkten Lichtkurven mit Hilfe des WATER-PAM Chlorophyll Fluorometers aufgenommen. Nach vorhergehender Dunkeladaptierung und Bestimmung von F_0 und F_m wurde die photosynthetisch aktive

Strahlung (PAR) innerhalb von 5 min in Schritten von ca. 30 μE auf 1200 μE erhöht (siehe Abb. 42, Ausschnitt). Nach jedem Schritt erfolgte ein Sättigungspuls und die Fluoreszenzparameter Yield und die Elektronentransportrate wurden aufgenommen.

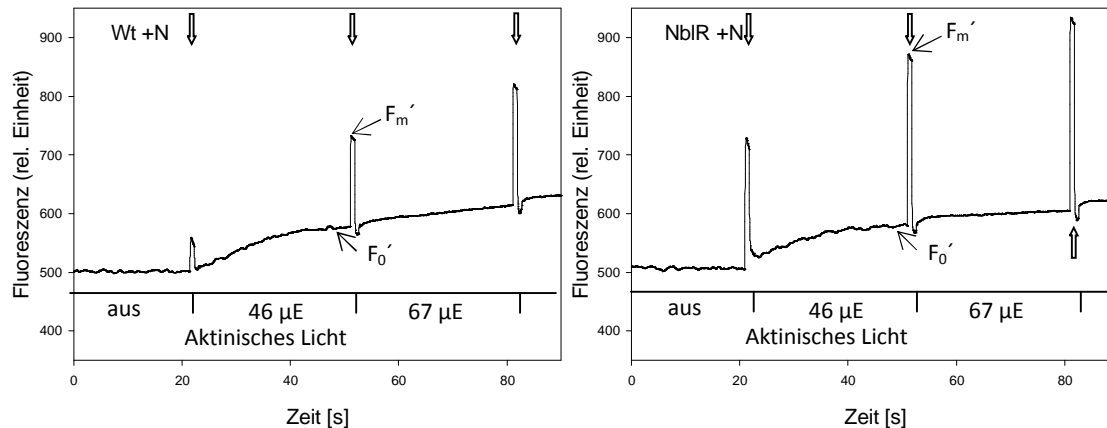


Abbildung 42 Chlorophyll-Fluoreszenzmessungen von *S. elongatus* Zellen unter stickstoffreichen Bedingungen. Die Fluoreszenzmessungen wurden an dunkeladaptierten Wildtyp- (Wt) und NbIR-Zellen im WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer durchgeführt. Die Abbildungen zeigen einen Ausschnitt der Lichtkurven bei angegebenen Fluenzraten des aktinischen Lichtes von Wildtyp und NbIR-Zellen. Die Pfeile zeigen die Gabe von Sättigungspulsen an.

Die effektive Quantenausbeute der photochemischen Energieumwandlung (Yield; F_v/F_m) wird aus dem Quotienten der variablen Fluoreszenz ($F_v = F_m' - F_0'$) und der maximalen Fluoreszenz (F_m') bestimmt (siehe Material und Methoden) und ist somit ein Maß für die Effizienz mit der die Anregungsenergie auf die offenen Reaktionszentren des PS II weitergeleitet werden. Unter Standardwachstumsbedingungen konnte im Wildtyp in dunkeladaptierten Zellen ein Yield von ca. 0,1 ermittelt werden (siehe Abb. 42). Nach Zuschalten von aktinischem Licht stieg die Grundfluoreszenz (F_0') im Wildtyp an. Bei einem aktinischen Licht von 46 μE konnte nach der Gabe eines Sättigungspulses im Wildtyp ein Yield von ca. 0,2 ermittelt werden. Dieser Anstieg des Yield-Wertes wurde durch eine stärkere Zunahme der variablen Fluoreszenz im Vergleich zur Grundfluoreszenz hervorgerufen (siehe Abb. 42), der durch die schnelle *state transition* ausgelöst wird. In der NbIR-Mutante hingegen war bereits in dunkeladaptierten Zellen die variable Fluoreszenz im Vergleich zum Wildtyp deutlich größer (siehe Abb. 42). Es konnte in dunkeladaptierten NbIR-Zellen ein Yield von ca. 0,3 ermittelt werden. Auch nach Zuschalten von aktinischem Licht blieb in der NbIR-Mutante der Yield bei ca. 0,3, da die Grundfluoreszenz und die variable Fluoreszenz gleichermaßen anstiegen (siehe Abb. 42). Dies deutet auf eine veränderte *state transition* in der NbIR-Mutante hin.

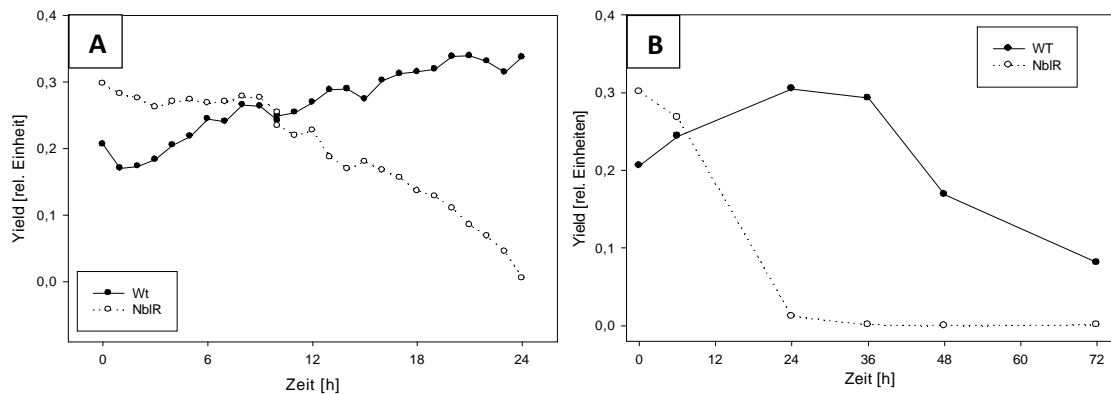


Abbildung 43 Quantenausbeute (Yield) von *S. elongatus* Zellen während der Stickstoff-Chlorose gemessen mit Hilfe des WATER-PAM Chlorophyll Fluorometers aus der maximalen Fluoreszenzausbeute (F_m') mit einem Sättigungspuls einer vorher belichteten Probe bei (A) $153 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und (B) $498 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und der gemessenen Fluoreszenzausbeute (F_0'). Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives Ergebnis.

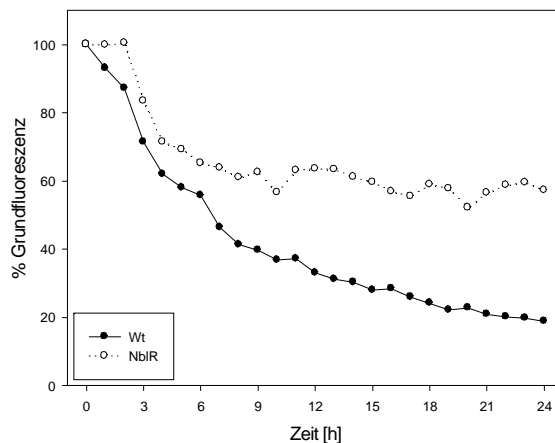


Abbildung 44 Grundfluoreszenz (F_0') von *S. elongatus* Zellen während der ersten 24 h der Stickstoff-Chlorose. Die Grundfluoreszenz (F_0') von Wildtyp (geschlossene Kreise) und NblR-Mutante (offene Kreise) wurde mit Hilfe der Chlorophyll Fluoreszenz einer belichteten Probe von $153 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, gemessen in der WATER-PAM, bestimmt. Die Grundfluoreszenz unmittelbar nach Stickstoffentzug wurde als 100 % definiert.

In den ersten Stunden nach Stickstoffentzug blieb der Yield in der NblR-Mutante konstant (siehe Abb. 43A). Im Anschluss daran sank F_v/F_m , verursacht von einer drastischen Abnahme der variablen Fluoreszenz, bis zwischen 24 h und 30 h nach Stickstoffentzug der Yield den Wert Null erreichte (siehe Abb. 43B).

Der F_v/F_m stieg im Wildtyp in den ersten Stunden nach Initiation des Stickstoffmangels an, da die maximale Fluoreszenz konstant blieb, jedoch die Grundfluoreszenz F_0' bei den gewählten Lichtintensitäten absank (siehe Abb. 44) und somit die variable Fluoreszenz anstieg. Nach 36 h Stickstoffmangel verringerte sich der Yield im Wildtyp langsam auf ein niedriges Niveau, da die maximale Fluoreszenz abnahm.

Zu den verschiedenen Chlorose-Zeitpunkten wurde aus den erfolgten Lichtkurven die maximale Elektronentransportrate bestimmt und gegen die Zeit nach Stickstoff-Entzug aufgetragen (siehe Abb. 45).

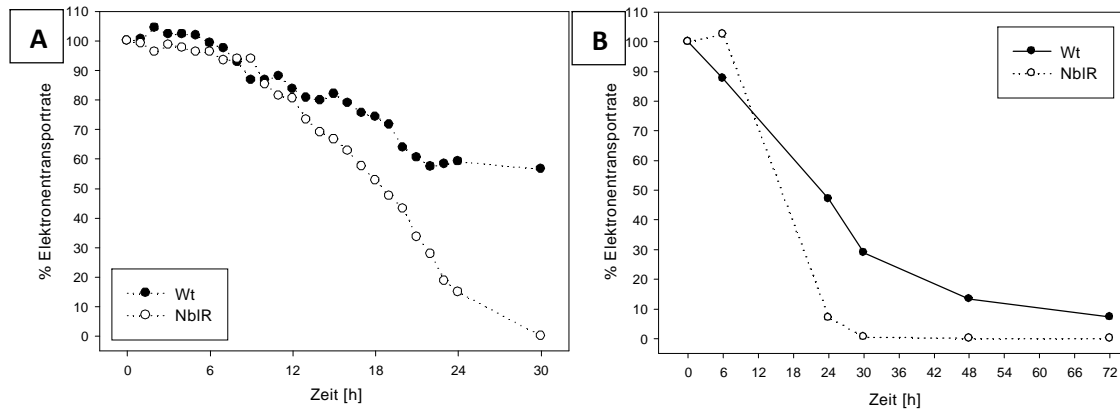


Abbildung 45 in vivo PSII Aktivität von *S. elongatus* Zellen während der Stickstoff-Chlorose. Die maximale Elektronentransportrate in % von Wildtyp- (geschlossene Kreise) und NblR- (offene Kreise) Zellen gemessen im WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer zu den angegebenen Zeitpunkten. (A) Elektronentransportrate in % während der ersten 24 Stunden nach Stickstoffentzug (B) Elektronentransportrate % während längerer Stickstoff-Chlorose. Die 100 % Werte beziehen sich auf die apparente photosynthetische Elektronentransportrate vor dem Stickstoff-Entzug. Die Versuche wurden dreimal wiederholt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis.

Die photosynthetische Elektronentransportrate (ETR) blieb in der NblR-Mutante während der ersten sechs Stunden nach Stickstoffentzug noch konstant (siehe Abb. 45A) und sank anschließend innerhalb von 30 h auf Null (siehe Abb. 45B). Die Elektronentransportrate des Wildtyps sank graduell und deutlich langsamer als in der NblR-Mutante. In den ersten 24 h nach Stickstoff-Entzug sank die Elektronentransportrate im Wildtyp um 40 % und nach weiteren 24 h um insgesamt 80 %. Eine PSII Restaktivität blieb im Wildtyp jedoch auch nach andauernder Stickstoffchlorose bestehen (siehe Abb. 45B).

Der Erhalt der photosynthetischen Restaktivität ist notwendig um die Lebensfähigkeit und somit auch die Regenerationsfähigkeit der Zellen nach Zugabe von gebundenem Stickstoff sicher zu stellen. Da die NblR-Mutante jedoch eine drastische Reduktion der Elektronentransportrate während der Chlorose zeigte (siehe Abb. 45), wurde überprüft, ob die Zellen nach Stickstoffentzug noch in der Lage waren durch die Zugabe von Stickstoff zu regenerieren. Hierzu wurden Kulturen des Wildtyps und der NblR-Mutante zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stickstoffentzug auf stickstoffhaltigen Platten (BG11^N-Platten) aufgetropft oder ausplattiert, unter Standardbedingungen inkubiert und die CFU bestimmt (siehe Abb. 46).

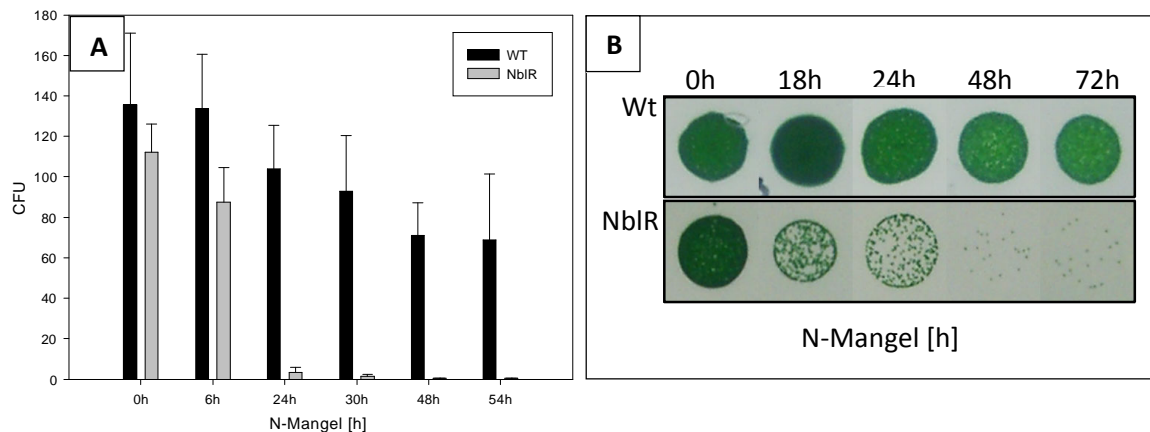


Abbildung 46 Regenerationsfähigkeit von *S. elongatus* Zellen nach Stickstoffentzug. (A) Bestimmung der *colony forming units* (CFU) von verschiedenen Verdünnungen der Kulturen des Wildtyps (schwarze Balken) und der NblR-Mutante (graue Balken). Zeitpunkt 0 h sind Zellen direkt nach dem Stickstoff-Entzug. (B) 10 µl einer Stickstoffmangel-Kultur OD₇₅₀ 0,5 wurden nach angegebenen Zeitpunkten auf BG11^N-Platten aufgetropft und unter Standardbedingungen inkubiert.

Nach Stickstoffentzug verringerte sich die Zahl der überlebensfähigen Zellen des Wildtyps innerhalb von drei Tagen auf ca. 50 % (siehe Abb. 46A). Die Anzahl der regenerationsfähigen Zellen der NblR-Mutante war bereits 6 Stunden nach Stickstoff-Entzug deutlich reduziert (siehe Abb. 46A). Nach 24 Stunden waren nur noch 5 % der Zellen regenerationsfähig, nach 30 Stunden nur noch 1 % und bei länger andauerndem Mangel war keine Regeneration mehr zu beobachten (siehe Abb. 46).

Die Lebensfähigkeit der *S. elongatus* Zellen während des Stickstoffmangels wurde zusätzlich durch die Verwendung der Live/Dead BacLightTM-Färbung verfolgt. Durch diese Färbung erscheinen alle lebendigen Zellen grün und alle abgestorbenen Zellen erscheinen rot, da der interkalierende, rote Nukleinsäurefarbstoff nur in Zellen mit beschädigter Membran eindringen kann. Während dem Verlauf des Stickstoffmangels wurden Zell-Aliquots gefärbt und mikroskopiert. Zusätzlich wurde die Abnahme der roten Eigenfluoreszenz der Zellen, die durch die Phycobilisomen und Chlorophyll a unter UV Licht erzeugt wird, untersucht (siehe Abb. 47C).

Deutlich zu erkennen war die Abnahme der Eigenfluoreszenz in den Wildtyp-Zellen nach Initiation der Stickstoff-Chlorose. Bereits nach 24 h Stickstoffmangel war die Eigenfluoreszenz der Wildtyp-Zellen fast vollständig verschwunden, was mit der gemessenen Abnahme der Phycobilisomen zu erklären ist (siehe Abb. 40 und 47). In den NblR-Zellen blieb dagegen die Eigenfluoreszenz während des gesamten

Beobachtungszeitraumes bestehen, was den fehlenden Phycobilisomen-Abbau während der Chlorose bestätigt.

Die Unterschiede in der Lebensfähigkeit von Wildtyp- und NblR-Zellen während der Chlorose konnte durch die Live/Dead Färbung sehr gut verfolgt werden (siehe Abb. 47B). In der Wildtyp-Kultur waren nach 24 h Stickstoff-Chlorose noch keine roten Zellen zu erkennen, was bedeutet, dass die Zellen noch lebendig waren. In der Wildtyp-Kultur traten abgestorbene, rote Zellen erst zwischen 48 und 96 h Stickstoff-Chlorose auf, während in der NblR-Kultur bereits nach 24 h Stickstoffmangel erste tote Zellen zu beobachten waren (siehe Abb. 47B). Zwischen 48 h und 96 h waren dann die gesamten NblR-Zellen orange-rot-fluoreszierend. Die Live/Dead Färbung deutete auch darauf hin, dass ein großer Anteil der noch grün-fluoreszierenden, lebenden NblR-Zellen nach 24 h schon ihre Regenerationsfähigkeit verloren hatten, da der Anteil der regenerierenden Zellen auf festem Medium nur bei 5 % lag (siehe Abb. 46A). Auch ein Teil der grün-fluoreszierenden Wildtyp-Zellen waren zur Regeneration nicht mehr fähig.

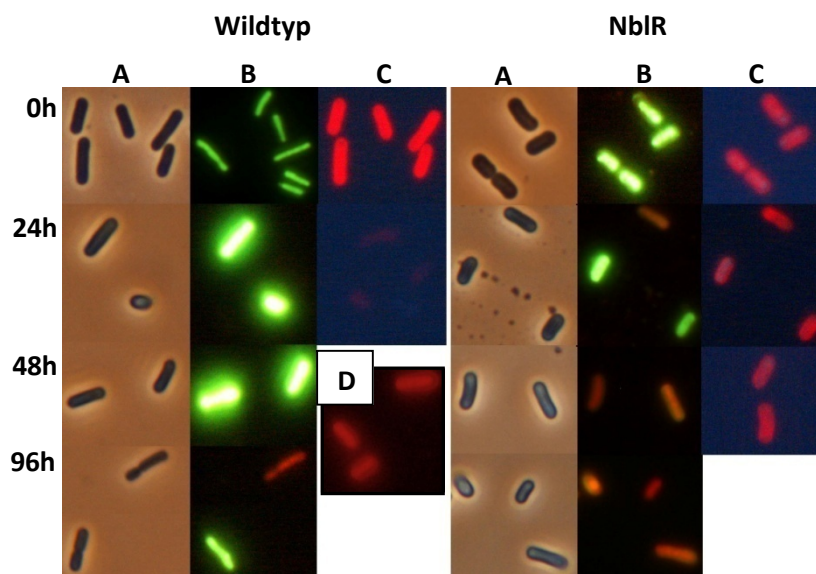


Abbildung 47 Mikroskopische Aufnahmen von *S. elongatus* Zellen im Stickstoffmangel nach Färbung mit Live/Dead BacLight™. Je 100 µl einer Wildtyp- (linke Seite) bzw. NblR- Kultur (rechte Seite) wurde zu den angegebenen Zeiten nach Stickstoff downshift für 15 min mit Live/Dead Färbung im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit (A) Phasenkontrast (B) UV-Licht für Live/Dead Färbung Filter B-2A (Ex 450-490) und (C) UV-Licht für die Autofluoreszenz (Phycobilisomen) der Zellen mit Filter UV 2A (Ex 330-380) bestrahlt und bei 1000 x Vergrößerung mikroskopiert. (D) Live/Dead Färbung von Zellen die für 5 min bei 95 °C abgetötet wurden (Filter wie in (B)).

3.3. Gesamtproteinmuster von Wildtyp- und NblR-Zellen während der ersten Phase der Chlorose

Im Verlauf der Anpassung an den Stickstoffmangel konnte bereits gezeigt werden, dass *S. elongatus* Wildtyp-Zellen einen Teil ihrer Proteine abbauen. Daher wurde der Abbau der Proteine im Wildtyp mit der NblR-Mutante verglichen. Hierfür wurden gleiche Zellmengen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Chlorose in SDS-Probenpuffer lysiert, in eindimensionaler SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht (siehe Abb. 48). Es traten deutliche Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der NblR-Mutante auf. Während im Wildtyp die Gesamtproteinmenge zwischen 14 und 45 kDa stetig abnahm, reagierte die NblR-Mutante zunächst kaum. Besonders deutlich zeigte sich hier der verringerte Abbau der Phycobilisomen, im Molekulargewichtsbereich zwischen 16 und 21 kDa (siehe Abb. 48). Mit dem Absterben der NblR-Zellen ging auch ein Verlust der Gesamtproteine einher.

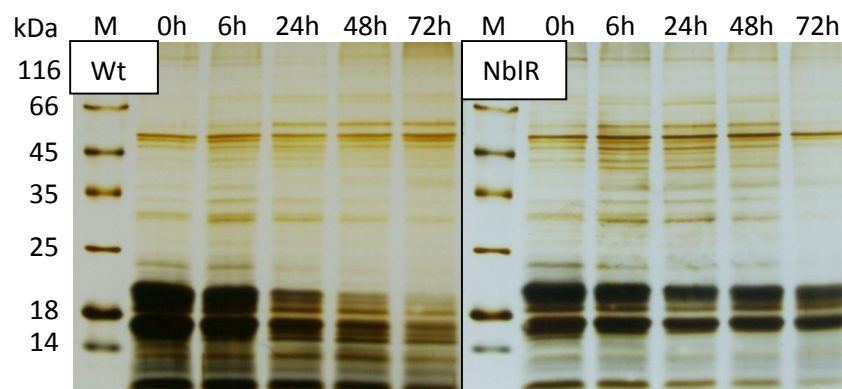


Abbildung 48 Silbergefärbte eindimensionale SDS-PAGE von *S. elongatus* Zellen. Kulturen von *S. elongatus* Wildtyp und NblR-Mutante wurden von stickstoffreiches auf stickstoffarmes Medium überführt und unter Standardbedingungen weiter inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und das Zellpellet in SDS-Probenpuffer lysiert. Je eine OD₇₅₀ von 0,1 wurde auf einer 12,5 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend silbergefärbt. (M) Proteingrößenstandard

Während des Differenzierungsprozesses kommt es neben dem Protein-Abbau auch zur Neubildung von Proteinen. Durch 2D-Gelanalysen konnten bereits einige Proteine unterschieden werden, die spezifisch im Stickstoffmangel oder auch durch Schwefelmangel induziert oder reprimiert werden (Aldehni *et al.*, 2003).

Durch die vorangegangenen Untersuchungen in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das NblR-Protein essentiell für die Anpassung und das Überleben im Stickstoffmangel ist. Um ein Überleben während des Mangels zu gewährleisten, muss

der gesamte Stoffwechsel der Zellen umgestellt werden. Hierfür müssen auch neue Proteine synthetisiert werden. Durch eine Markierung mit S^{35} -Methionin wurde die Neusynthese von Proteinen im Wildtyp und der NblR-Mutante während der Chlorose untersucht. Die markierten Proteine wurden anschließend in einer zweidimensionalen SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiografisch detektiert.

Im Proteinmuster konnten nur sehr wenige Unterschiede zwischen Wildtyp und NblR-Mutante detektiert werden (siehe Abb. 49). Auffällig war jedoch die geringere Einbaurrate von S^{35} -Methionin in der NblR-Mutante nach Stickstoffentzug. So konnte auch durch eine ergänzende Diplomarbeit bewiesen werden, dass die Proteinbiosyntheserate in stickstofffreiem Medium in der NblR-Mutante signifikant vermindert war (Wellen, 2008).

Durch einen Vergleich von silbergefärbten und autoradiografischem Abbild zeigte sich im Wildtyp, dass nicht nur ein PBS Abbau erfolgte (siehe Abb. 49, Ag-gefärbt (A)) sondern zusätzlich die Neusynthese von Phycobilisomen reduziert war (siehe Abb. 49, S^{35}). Durch die Mikroarray-Analyse in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Wildtyp nach Stickstoffentzug auch die Menge an mRNA der Gene für Proteine des Allophycocyanins (*apcA*, *apcB*, *apcL*, *apcE*) und Phycocyanins (*cpcA*, *cpcB*, *cpcH*, *cpcI*), der Bestandteile der Phycobilisomen reprimiert wurden (siehe Abschnitt B, Tab. 14). In der NblR-Mutante war auch nach sechs Stunden noch eine Neusynthese von Phycobilisomen nachzuweisen (siehe Abb. 49). Die Mikroarray-Analyse zeigte, dass die Gene des Phycocyanins (*cpc*) in der NblR-Mutante nach 6 h Stickstoffchlorose noch nicht wie im Wildtyp reprimiert wurden (siehe Abschnitt B, diese Arbeit). Eine Repression der Gene des Phycocyanins (*cpc*) trat in der NblR-Mutante erst nach 24 h Stickstoffentzug auf.

Der Vergleich der S^{35} -Methionin markierten Proteine von Wildtyp und NblR-Mutante zeigte, dass einige im Stickstoffmangel im Wildtyp induzierte Proteine in der NblR-Mutante nicht synthetisiert wurden. Mit Hilfe der Auswertung von bereits veröffentlichten 2D-Analysen konnte ein in der NblR-Mutante vermindert synthetisiertes Protein als Nsi5 Protein identifiziert werden. Das Nsi5 Protein gehört zu den spezifisch im Stickstoffmangel induzierten Proteinen (*nitrogen starvation induced_nsi5*). In den Mikroarray-Analysen in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das *nsi5*-Gen zu den im Wildtyp am höchsten induzierten Genen im Stickstoffmangel gehört (siehe Abschnitt B).

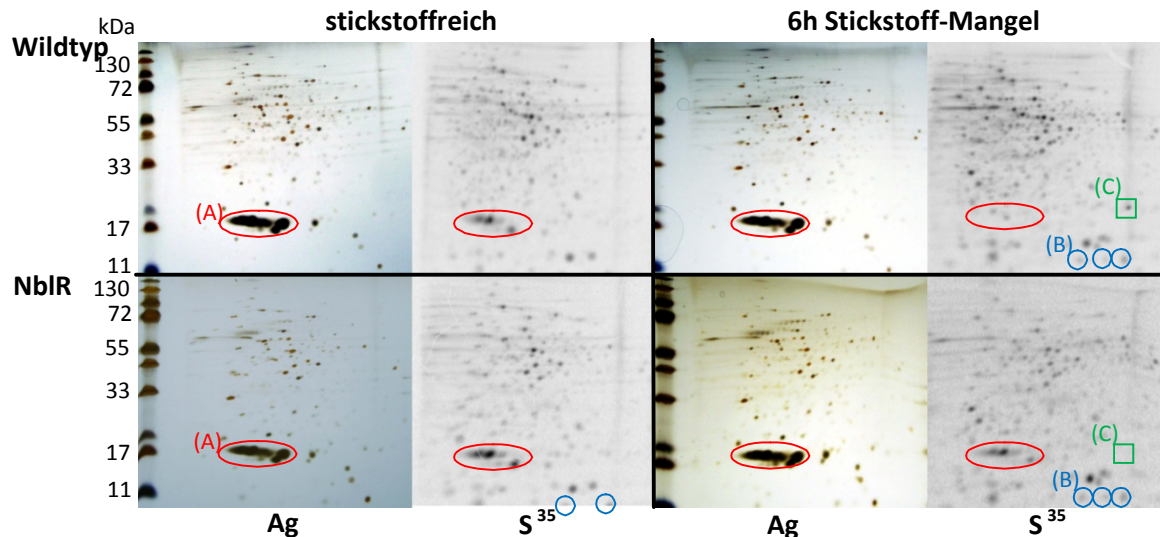


Abbildung 49 Zweidimensionale Gelanalysen von *S. elongatus* Zellen unter stickstoffreichen und stickstofffreien Bedingungen. Zellen einer Wildtyp- und NblR-Kultur in Standard BG11^N-Medium (stickstoffreich) und 6 h nach Stickstoff-Entzug wurden für jeweils 1 h mit ³⁵S-Methionin markiert. Je 2,5 µg Protein wurde durch 2D-PAGE aufgetrennt, silbergefärbt und anschließend die Neusynthese von Proteinen autoradiografisch detektiert. (Ag) silbergefärbte Gele, (S³⁵) ³⁵S-Methionin radiografisch, (A) Phycobilisomen, (B) PII-Protein, (C) Nsi5-Protein

3.4. Analyse des D1 Proteins des Photosystems II

Das D1 Protein ist eines der zwei zentralen Proteine im Reaktionszentrum des Photosystems II. Es ist das Schlüsselement im photosynthetischen Elektronentransport und in der Stressanpassung. Dieses Protein unterliegt einem sehr schnellen Licht-abhängigen Austausch. Da die Aktivität des PSII während des Stickstoffmangels nur auf ein geringes Niveau im Wildtyp absank, jedoch in der NblR-Mutante auf Null gefallen war (siehe Abschnitt C, 3.2), wurde die Menge an D1 Protein durch Western Blot Analyse untersucht.

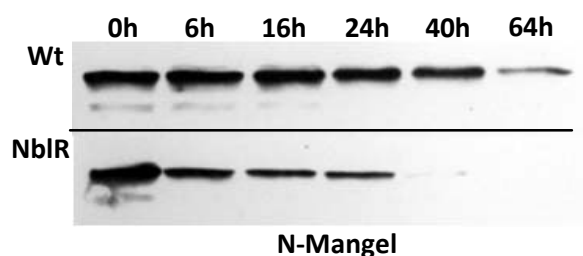


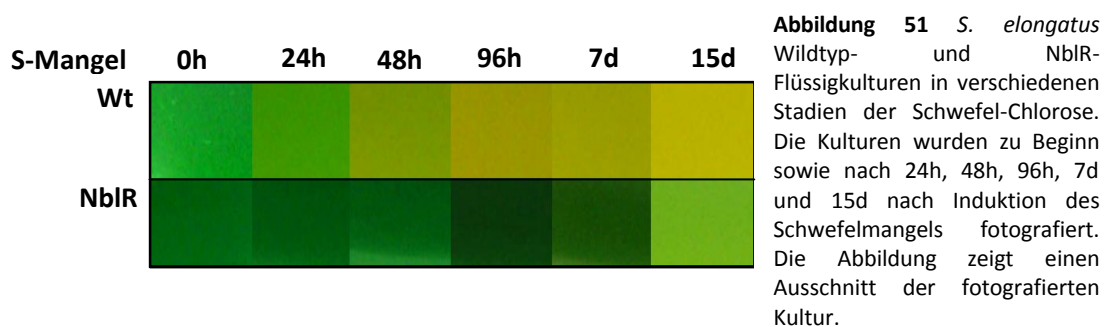
Abbildung 50 Western-Blot-Analyse des D1 Proteins während Stickstoffchlorose. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach dem Stickstoffentzug wurden Proben der Wildtyp und NblR-Kultur entnommen. Die Zellen wurden aufgebrochen und je 10 µg des Pellets einer 21.000 g Zentrifugation für die Analyse verwendet.

In den Wildtyp Zellen blieb die D1 Proteinmenge während der ersten ein bis zwei Tage der Stickstoffchlorose konstant und wurde dann langsam geringer (siehe Abb. 50). In den NblR Zellen dagegen war bereits nach 6 h die D1 Proteinmenge um mehr als die

Hälfte reduziert und konnte schließlich ab 40 h nach Stickstoffentzug nicht mehr detektiert werden. Der Verlust an D1 Protein ging mit dem Verlust der Lebensfähigkeit und einer schnellen Reduktion der PS II Aktivität in der NblR-Mutante einher (siehe Abb. 45 und 46).

3.5. Phänotypische Charakterisierung der *S. elongatus* Zellen unter Schwefelmangel

Ein weiterer essentieller Nährstoff für Cyanobakterien stellt Schwefel dar. Ein Mangel an Schwefel führt in *S. elongatus* Zellen wie im Stickstoffmangel zu einem *bleaching* Prozess, der mit einem Abbau der Phycobilisomen und des Chlorophyll a einhergeht. Der Differenzierungsprozess läuft zeitlich langsamer ab, als die durch Stickstoffmangel ausgelöste Anpassung. Dies war auch an der Färbung der Wildtyp- und NblR-Kulturen zu erkennen (siehe Abb. 51). Nach 24 h Schwefel-Entzug war die Wildtyp-Kultur noch deutlich grüner als die Kultur nach Stickstoffmangel (vergl. Abb. 39 und 51). Die Kultur der NblR-Mutante zeigte auch nach Schwefelentzug einen *nonbleaching* Phänotyp. Die NblR-Kultur erreichte nach Schwefelentzug eine deutlich höhere Zelldichte als nach Stickstoffentzug. Eine Aufhellung der NblR-Kultur konnte mit dem fünften Tag nach Schwefelmangel beobachtet werden.



Der Unterschied zwischen Wildtyp und NblR-Mutante im Verlauf der Schwefel-Chlorose konnte auch durch Ganz-Zell-Absorptionsspektren dargestellt werden (siehe Abb. 52). Besonders auffällig war hier die Zunahme der Phycobilisomen (Absorptionsmaxima bei 630 nm), sowie des Gehaltes an Chlorophyll a um 10 % (Maxima bei 440nm und 680 nm, bestimmt nach Myers, 1980, siehe Material und Methoden) nach 6 h Schwefelmangel in beiden Stämmen. Der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante trat deutlich nach 24 h Schwefelmangel auf. Die Reduktion des Absorptionsmaxima des Wildtyps bei

440 nm, 630 nm sowie bei 680 nm wiesen auf einen Abbau von Chlorophyll a und Phycobilisomen hin (siehe Abb. 52). Der Gehalt an Phycobilisomen wurde im Wildtyp im Schwefelmangel um ca. 45 % reduziert, der an Chlorophyll a um etwa 15 %. Während das Spektrum der NbIR-Mutante bis auf eine Reduzierung des Carotinoid-Peaks bei 440 nm unverändert blieb (siehe Abb. 52). Nach 24 h Schwefelmangel konnte im Spektrum der NbIR-Mutante noch keine Abflachung der GesamtabSORPTION wie nach Stickstoffentzug beobachtet werden.

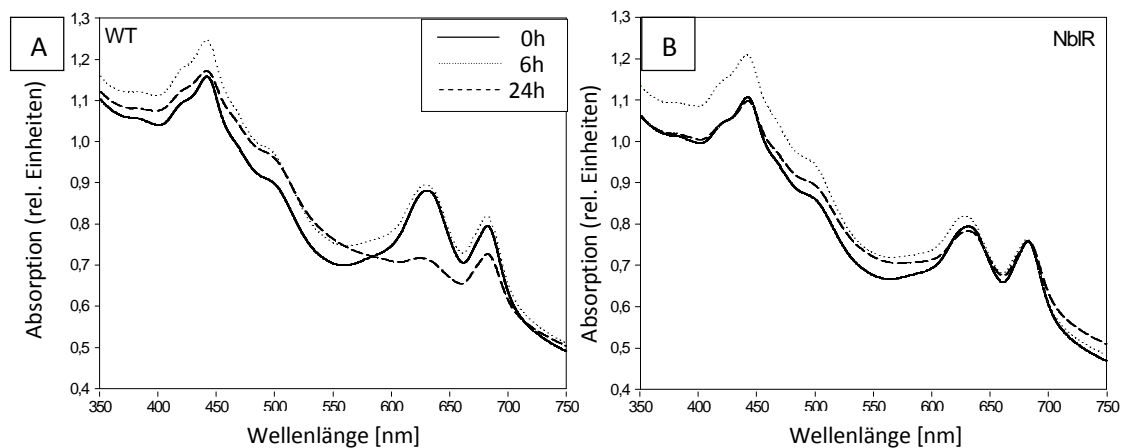


Abbildung 52 Absorptionsspektren von *S. elongatus* Zellen nach Initiation eines Schwefelmangels. Von (A) Wildtyp- und (B) NbIR- Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Ganz-Zell-Spektren im Spektralphotometer von 350 nm bis 750 nm erstellt.

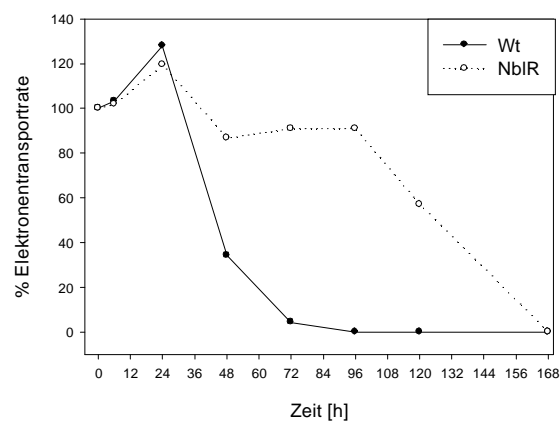


Abbildung 53 in vivo PSII Aktivität von *S. elongatus* Zellen während Schwefelmangel. Die maximale Elektronentransportrate in % von Wildtyp- (geschlossene Kreise) und NbIR- (offene Kreise) Zellen wurde im WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Die Elektronentransportrate ist in % während längerer Stickstoff-Chlorose angegeben. Die 100 % Werte beziehen sich auf die apparente photosynthetische Elektronentransportrate vor dem Schwefel-Entzug.

Um die photosynthetische PSII Aktivität der Wildtyp- und NbIR-Zellen während des Verlaufs des Schwefel-Mangels zu beobachten, wurde die Elektronentransportrate mit Hilfe des WATER-PAM Chlorophyll Fluorometers bestimmt (siehe Abb. 53). Die maximale Elektronentransportrate zeigte im Schwefelmangel einen anderen Verlauf als bei Stickstoff-Chlorose (vergl. Abb. 53 und 45). In den ersten Stunden nach Entzug des Schwefels nahm die Elektronentransportrate im Wildtyp und in der NbIR-Mutante zu, da die variable Fluoreszenz F_v stärker zunahm als die maximale Fluoreszenz F_m' , was zu

einem Anstieg der Quantenausbeute (Yield) und somit zu erhöhter Elektronentransportrate führte. Zwischen 24 h und 72 h sank im Wildtyp die variable Fluoreszenz stärker als die maximale, der Yield nahm ab. In der NbIR-Mutante hingegen blieb die Quantenausbeute nach einer leichten Abnahme bis 48 h für weitere 48 h konstant und sank anschließend rasch bis auf Null ab (siehe Abb. 53). Im Wildtyp lies sich zu diesem Zeitpunkt noch eine sehr schwache PS II Restaktivität messen. Da diese Restaktivität entscheidend für das Überleben der Zellen ist, wurde die Regenerationsfähigkeit von Wildtyp und NbIR-Mutante auf schwefelhaltigen Agarplatten getestet (siehe Abb. 54).

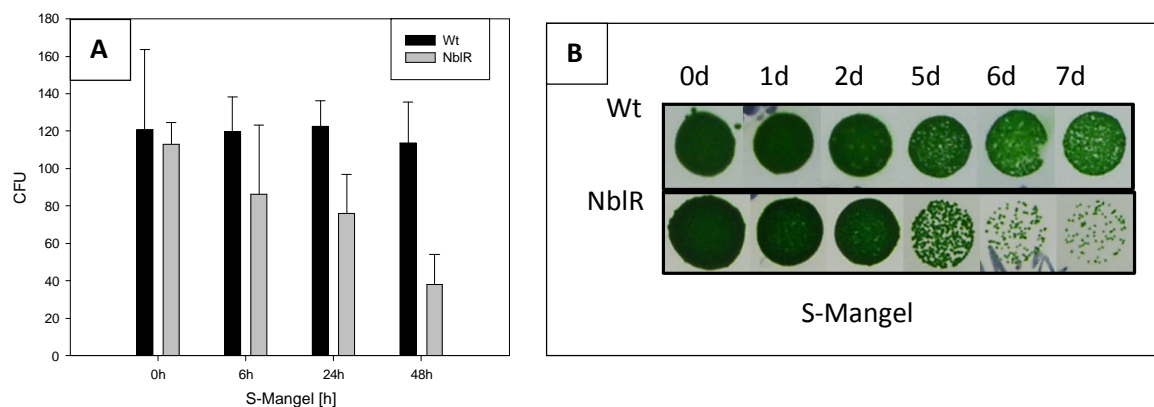


Abbildung 54 Regenerationsfähigkeit von *S. elongatus* Zellen während Schwefelmangel. (A) Verschiedene Verdünnungen von Kulturen des Wildtyps (schwarze Balken) und der NbIR-Mutante (graue Balken) wurden auf BG11^N-Platten ausplattiert, unter Standardbedingungen inkubiert und die colony forming units (CFU) bestimmt. Zeitpunkt 0 h sind Zellen direkt nach dem Schwefel-Entzug. (B) 10 µl einer Stickstoffmangel-Kultur OD₇₅₀ 0,5 nach angegebenen Zeitpunkten wurde auf BG11^N-Platten aufgetropft und unter Standardbedingungen inkubiert

Die Anzahl der regenerationsfähigen Wildtyp Zellen nach Schwefelmangel blieb über einen deutlich längeren Zeitraum im Vergleich zum Stickstoffmangel konstant (siehe Abb. 46 und 54A) und verringerte sich anschließend langsam um ca. 50 %. Im Gegensatz zum Wildtyp sank die Anzahl der regenerationsfähigen NbIR-Zellen sofort nach Schwefelentzug ab (siehe Abb. 54A). Die NbIR Zellen überlebten jedoch einen Schwefelmangel deutlich länger als einen Stickstoffmangel. Erst nach etwa 4-5 Tagen der Schwefel-Chlorose konnte bei der NbIR-Mutante eine deutlich reduzierte Zellzahl auf den aufgetropften Agar-Platten nachgewiesen werden (siehe Abb. 54B), was einer verminderten Überlebensfähigkeit um ca. 70 % entsprach.

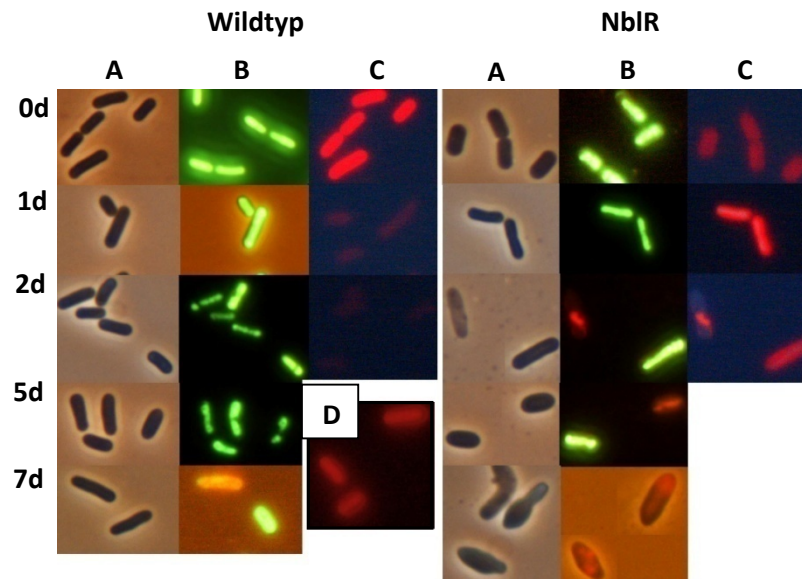


Abbildung 55 Mikroskopische Aufnahmen von *S. elongatus* Zellen nach Schwefelentzug und nach Färbung mit Live/Dead BacLight™. Je 100 µl einer Wildtyp (linke Seite) bzw. NbIR- (rechte Seite) Kultur wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Schwefelmangel-Induktion für 15 min mit Live/Dead Färbung im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit (A) Phasenkontrast (B) UV-Licht für Live/Dead Färbung Filter B-2A (Ex 450-490) und (C) UV-Licht für die Autofluoreszenz (Phycobilisomen) der Zellen mit Filter UV 2A (Ex 330-380) bestrahlt und bei 1000 x Vergrößerung mikroskopiert. (D) Live/Dead Färbung von Zellen die für 5 min bei 95 °C abgetötet wurden (Filter wie in (B)).

Die Wildtyp- und NbIR-Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Entzug des Schwefels mikroskopiert und zusätzlich mit einer Live/Dead Färbung angefärbt (siehe Abb. 55). Die Eigenfluoreszenz der Zellen, die durch die Phycobilisomen und Chlorophyll a unter UV Licht erzeugt wird, war im Wildtyp nach 24 h deutlich reduziert und blieb in der NbIR-Mutante über den gesamten Untersuchungszeitraum erhalten (siehe Abb. 55C). Ein gleich bleibender Gehalt an Chlorophyll a und Phycobilisomen konnte auch in den Ganz-Zell-Spektren der Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 52). Deutlich konnte gezeigt werden, dass die NbIR-Zellen den Schwefel-Entzug signifikant länger überlebten als den Stickstoff-Entzug. Fünf Tage nach Initiation des Schwefelmangels konnten immer noch grün-fluoreszierende, lebende Zellen in der NbIR-Kultur nachgewiesen werden (siehe Abb. 55B). Nach sieben Tagen der Chlorose waren jedoch ca. 90 % der NbIR-Zellen abgestorben. Somit führte auch ein Schwefelmangel zu einem Absterben der NbIR-Kultur, während der Wildtyp diese Stressbedingungen überlebte.

3.6. Gen-Expressionsanalyse während Stickstoff- und Schwefelmangel

Die Unterschiede auf Ebene der Proteinbiosynthese von Wildtyp und NblR-Mutante wurden zusätzlich auf Expressionsebene durch Northern-Blot-Analyse untersucht (siehe Abb. 56). Analysiert wurde das *psbA* Gen, das für das D1 Protein im Photosystem II (PSII) codiert. *PsbAI* codiert für das D1:1 Protein, das unter normalen Wachstumsbedingungen synthetisiert wird, *psbAII* und *psbAIII* ersetzt das D1 durch D1:2 unter Starklichtbedingungen (Golden *et al.*, 1986; Schaefer & Golden, 1989). Die Expression der *psbA* Gene unter Stickstoff- bzw. Schwefel-Mangel wurde bisher nicht untersucht.

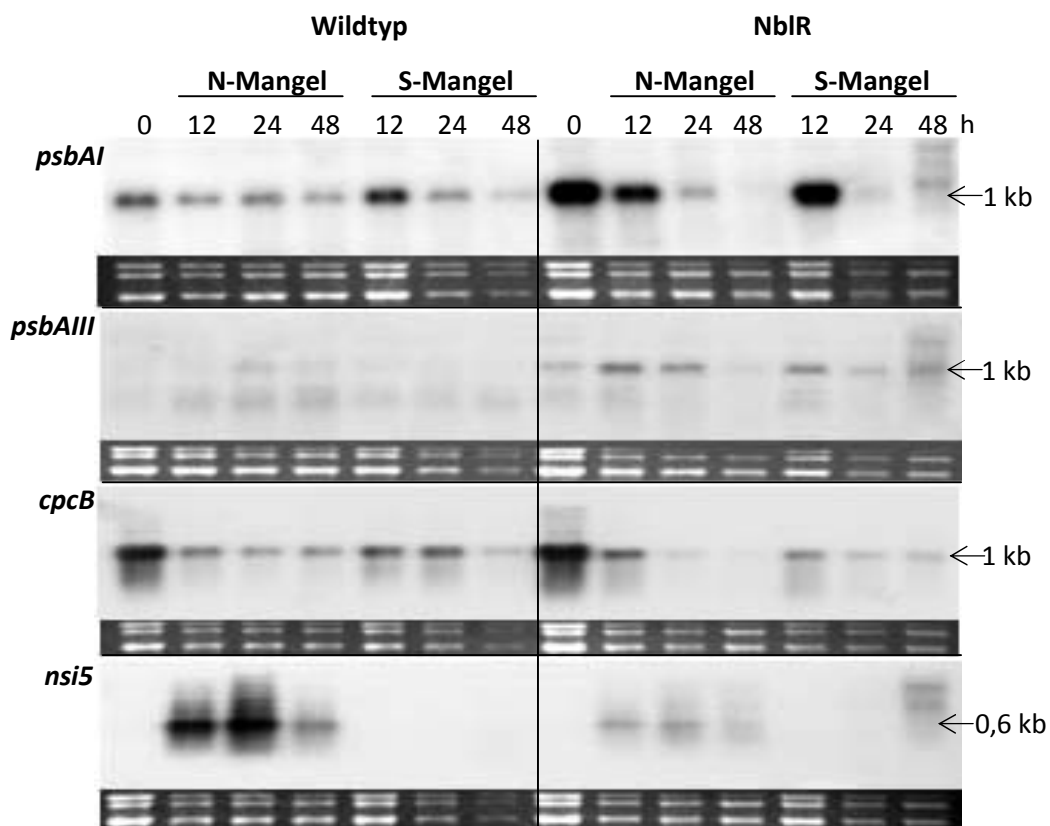


Abbildung 56 Northern-Blot-Analyse der Transkripte von *psbAI*, *psbAIII*, *cpcB* und *nsi5* von Wildtyp- (links) und NblR- (rechts) Zellen in Medium mit Stickstoff und nach angegebenen Zeiten (in h) nach Stickstoff- (N-Mangel) bzw. Schwefel (S-Mangel)-Entzug. Jeweils unterhalb des Northern Blots die dazugehörige RNA-Menge.

Aufgrund unterschiedlicher RNA-Mengen in der Gelelektrophorese für den Northern-Blot wurde eine qualitative Analyse durchgeführt und auf eine Quantifizierung der Transkriptmengen verzichtet.

Nach 48 h Stickstoffmangel sind die Zellen der NblR-Mutante bereits tot. Zu diesem Zeitpunkt konnten in den Northern-Blot-Analysen auch keine Transkripte mehr nachgewiesen werden (siehe Abb. 56), während nach 48 h Schwefelmangel noch geringe

Transkriptmengen nachgewiesen werden konnten, was noch einmal verdeutlicht, dass die NblR-Mutante Schwefelmangel deutlich länger überleben kann.

Im Wildtyp wurde die Menge an *psbA* Transkript während der ersten Stunden der Chlorose reduziert (siehe Abb. 56), was mit dem kontinuierlichen Absinken der PSII Aktivität einherging. Die Verringerung des *psbA* Transkripts im Wildtyp trat bei Schwefelmangel erst nach 24 h ein. Erstaunlicherweise war die Menge an *psbA* in der NblR-Mutante in stickstoffreichen Bedingungen gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöht, was auf einen vermehrten Austausch des D1 Proteins hindeuten könnte. Des Weiteren konnte in den Mikroarray-Analysen gezeigt werden, dass das Transkript von *ctpA*, einer Serin Protease, in der NblR-Mutante im Vergleich zum Wildtyp in stickstoffhaltigem Medium erhöht war (siehe Abschnitt B, Tab. 8). Die Protease CtpA ist an der C-terminalen Prozessierung des D1 Proteins beteiligt. Die erhöhte Transkriptmenge von *psbA* und *ctpA* deuten auf einen häufigeren Austausch des D1 Proteins hin.

In der NblR-Mutante war wie im Wildtyp die Verringerung des *psbA* Transkripts während des Schwefelmangels langsamer als im Stickstoffmangel (siehe Abb. 56). Die Menge an *psbAIII* Transkript nahm in der NblR-Mutante sowohl nach Stickstoff- als auch Schwefelentzug zu, was auf vermehrten Stress in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp hinweisen könnte, da die Transkription von *psbAIII* durch verschiedene Stressbedingungen (Starklicht, UV-Licht) induziert werden kann (Campbell *et al.*, 1998; Schaefer & Golden, 1989).

Die Transkriptmenge an *cpcB*, das für Phycocyanin, einer Untereinheit der Phycobilisomen kodiert, war im Wildtyp und in der NblR-Mutante nach 12 h Stickstoff- und Schwefelmangel reduziert (siehe Abb. 56). In den Mikroarray-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Menge an mRNA von *cpcB* im Wildtyp bereits nach 6 h Stickstoffmangel reduziert war, während in der NblR-Mutante zu diesem Zeitpunkt noch keine Repression zu erkennen war (siehe Abschnitt B, Tab. 15). Die Abnahme der mRNA-Menge von *cpcB* in der NblR-Mutante musste somit zwischen 6 und 12 h Stickstoff-Chlorose beginnen, was mit dem Verlust der Lebensfähigkeit und der PS II Aktivität korrelierte (vergl. Abb. 43 und 46). Im Wildtyp wurde das *cpc* Transkript in den ersten

Stunden nach Stickstoff- und Schwefelentzug reduziert, blieb dann jedoch sowohl nach längerem Stickstoff- als auch nach Schwefel-Entzug konstant (siehe Abb. 56). So konnte durch 2D-Analysen gezeigt werden, dass auch nach längerer Mangelperiode noch geringe Mengen an Phycobilisomen produziert werden (Görl *et al.*, 1998).

Der in den 2D-Gelanalysen dargestellte Unterschied in der Proteinmenge des Nsi5 konnte auch auf Ebene der Transkription nachgewiesen werden. Sowohl durch Northern Blot Analyse als auch durch Mikroarray-Analyse konnte gezeigt werden, dass das *nsi5* Gen spezifisch im Stickstoffmangel im Wildtyp sehr stark induziert wurde, während die Zunahme des Transkripts in der NblR-Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringert war (siehe Abb. 56 und Abschnitt B, Tab. 12). Somit konnte ein neues in der NblR-Mutante spezifisch im Stickstoffmangel fehlreguliertes Gen identifiziert werden.

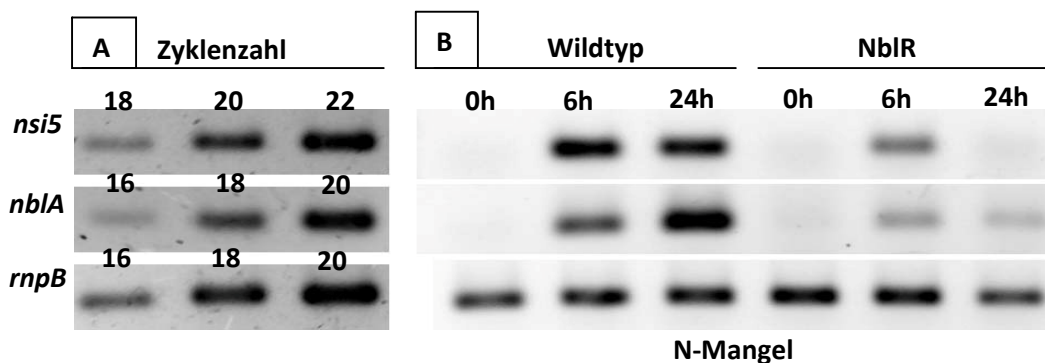


Abbildung 57 Expressionsanalyse des *nblA* und des *nsi5* Gens während Stickstoffmangel durch semiquantitative RT-PCR. Die Proben wurden zu den oben angegebenen Zeitpunkten nach Stickstoffentzug entnommen und die RNA nach Roche isoliert (siehe Material und Methoden). (A) Die Zyklenzahl der untersuchten Gene wurden mit der RNA aus dem Wildtyp nach 24 h Stickstoffmangel überprüft. (B) Für das *nsi5* Gen wurden 19 Zyklen, für *nblA* 18 Zyklen und für die Kontrolle *rnpB* 17 Zyklen in der RT-PCR durchgeführt.

Die Expression der Gene *nsi5* und *nblA* von Wildtyp gegenüber der NblR-Mutante während Stickstoffmangel wurde zusätzlich mit Hilfe semi-quantitativer RT-PCR untersucht. Zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Menge in der RT-PCR-Reaktion wurde die Expression des konstitutiv exprimierten Genes *rnpB* verwendet, das für die Untereinheit B der RNaseP in *S. elongatus* kodiert. Zunächst wurde für jedes Gen durch unterschiedlichen Zyklenzahlen die Sättigung der Amplifikation bestimmt (siehe Abb. 57 Zyklenzahl). Die Zyklenzahl im mittleren Bereich vor der Sättigung wurde für weitere Experimente verwendet. Für das Gen *nsi5* wurde die RT-PCR mit 19 Zyklen, *nblA* mit 18 Zyklen und *rnpB* mit 17 Zyklen durchgeführt.

Die RT-PCR zeigte einen starken Anstieg der *nsi5* Expression im Wildtyp bereits sechs Stunden nach Stickstoffentzug (siehe Abb. 57). In der NblR-Mutante hingegen war dieser Anstieg signifikant schwächer, was die Ergebnisse der Northern-Blot-Analyse und der Mikroarray-Analyse noch einmal bestätigte. Deutlich schwächer war auch die Expression des *nblA* Genes in der NblR-Mutante, während die Expression im Wildtyp bis 24 h nach Stickstoffentzug zunahm.

3.7. Aufreinigung von rekombinanten NblR aus *E. coli*

Für biochemische Analysen wurde das NblR-Protein über einen His-tag am C-terminalen Ende (pQE-60, Qiagen) und N-terminalen Ende (pET15b, Novagen) über Ni-NTA gereinigt. Dabei eluierte das native NblR Protein jeweils in zwei voneinander getrennten Maxima (siehe Abb. 58). NblR gehört aufgrund von Sequenzvergleichen zu den DNA-bindenden Response Regulatoren des Zwei-Komponentensystems. Dies führte zu der Hypothese, dass NblR nativ auch als Dimer vorliegen könnte und der damit verbundene „doppelte“ His-tag könnte stärker an die Ni-NTA-Oberfläche der Säule binden. Die verschiedenen Elutionsmaxima könnten somit durch die Bindung von NblR als Monomer oder Dimer verursacht werden.

Die verschiedenen Elutionsmaxima wurden in getrennten Fraktionen gesammelt. Die Elutionsfraktionen 1 und 2 (F. 1) wurden hierbei von den Fraktionen 4 – 6 (F. 2) getrennt (siehe Abb. 58). Zusätzlich wurden die Elutionsmaxima in vereinten Fraktionen gesammelt und alle Proben gegen Lagerpuffer dialysiert.

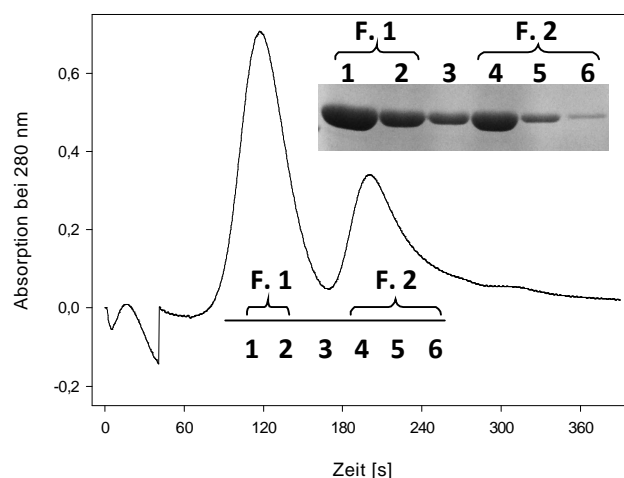


Abbildung 58 Elutionsprofil und Western-Blot der His-NblR-Aufreinigung. Die Membran des Western Blots wurde mit α -NblR Antikörper behandelt. Die Zahlen des Western-Blots entsprechen den angegebenen Zahlen der Elutionsfraktionen. Die Aufreinigung erfolgte über eine His-Select™-Säule (1ml Ni-NTA, Sigma) an einem BioLogic Control System. Durchführung siehe Abschnitt C Material und Methoden.

3.8. Bestimmung des Molekulargewichtes

3.8.1. Eichung der Gelfiltrationssäule

Die Gelfiltration der verwendeten Standards ergaben folgende Elutionsvolumina:

Tabelle 24 Elutionsvolumina der Standardansätze zur Eichung der Gelfiltrationssäule **Superdex 200**. Angegeben sind die verwendeten Standards mit den dazugehörigen Molekulargewichten, Elutionsvolumina (V_e), dem Ausschlussvolumen V_0 und deren Verhältnis V_e/V_0 . Durchführung siehe Abschnitt C Material und Methoden.

Standard	Molekulargewicht [Da]	Elutionsvolumen [ml]	V_e/V_0
Blue Dextran	2.000.000	8,4	1,00
BSA Albumin	66.000	14,8	1,76
Ovalbumin	43.000	15,5	1,85
Carboanhydrase	29.000	16,6	1,96
Cytochrom C	12.400	17,8	2,12

Das Ausschlussvolumen der *Superdex 200 HR 10/30* ergab sich aus dem Elutionsvolumen des *Blue Dextran*, da es auf Grund seines hohen Molekulargewichtes nicht in die Säulenmatrix eindringen kann. Das Verhältnis V_e/V_0 wurde in Abhängigkeit zum jeweiligen Molekulargewicht in einem Graphen aufgetragen (siehe Abb. 60).

3.8.2. Bestimmung des Molekulargewichtes von NbIR

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der verschiedenen Elutionsfraktionen aus der Aufreinigung von NbIR (siehe 3.7., Abschnitt C) wurden jeweils 100 µg Protein in Gelfiltrationspuffer auf die *Superdex 200* gegeben. Mit Hilfe des *BioLogic HR Chromatographie Systems* (Bio-Rad) wurde eine konstante Flussrate von 0,5 ml min⁻¹ gewährleistet und 250 µl große Fraktionen gesammelt.

Wie in Abbildung 59 zu sehen, waren die Elutionsprofile der Gelfiltrationssäule von F. 1 und F. 2, die den getrennt gesammelten Elutionsmaxima von der Ni-NTA Säule entsprechen (siehe 3.7., Abschnitt C), unterschiedlich. Das Hauptmaximum von F. 1 stimmte mit dem des F. 2 (entsprach dem zweiten Elutionsmaxima der Ni-NTA-Säule) nach 16,5 ml überein (siehe Tab. 25). Durch den Vergleich mit den Molekulargewichtsstandards lies sich ein Molekulargewicht von ca. 26.690 Da ermitteln (siehe Abb. 60), was der monomeren Form des NbIR Proteins von 26.963 Da entspricht.

Im Elutionsprofil von F. 2 konnte bereits nach ca. 15,1 ml ein erstes Maximum beobachtet werden, was einem Molekulargewicht von ca. 56.600 Da entspricht. Dies könnte sich um eine Dimere Form von NbIR handeln. Durch eine dimere Form und den damit verbundenen „doppelten“ His-tag könnte diese Form erst später von der Ni-NTA-Säule eluieren. Der größte Anteil im Elutionsprofil des NbIR Proteins des F. 2 der Ni-NTA-Säule eluierte im Molekulargewichtsbereich der monomeren Form von NbIR. Dies deutet darauf hin, dass die dimere Form des NbIR-Proteins sehr instabil sein könnte und durch die Dialyse und Lagerung des Proteins nach der Elution von der Ni-NTA-Säule in seine monomere Form zerfallen war.

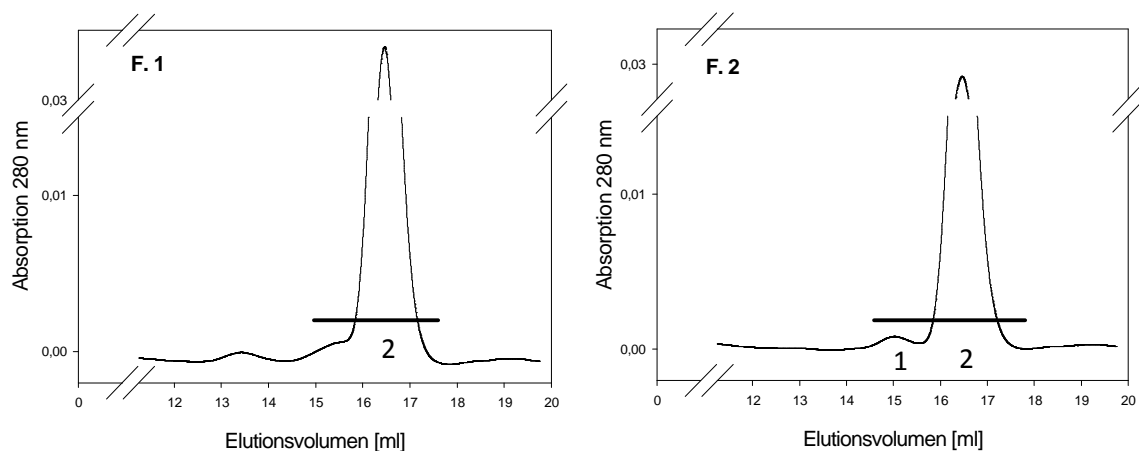


Abbildung 59 Elutionsprofil der Gelfiltration Superdex 200 von F. 1 (links) und F. 2 (rechts) (siehe 3.7., Abschnitt C) der NbIR Aufreinigung. Der schwarz markierte Bereich zeigt die NbIR-haltigen Fraktionen an, die durch Dot-Blot detektiert wurden. Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Protein in Gelfiltrationspuffer (Gesamtvolumen 250 µl)

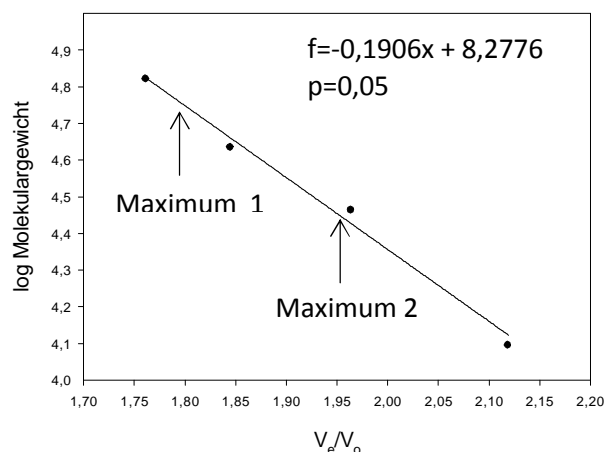


Abbildung 60 Eichgerade der Superdex 200 HR10/30. Die logarithmischen Molekulargewichte der Standards sind gegen das Verhältnis aus Elutionsvolumen (V_e) und Ausschlussvolumen (V_0) aufgetragen. (1) BSA, 66 kDa; (2) Ovalbumin, 43 kDa; (3) Carboanhydrase, 29 kDa; (4) Cytochrom C, 12,4 kDa. Die entsprechenden Elutionszeitpunkte der Maxima von Maximum 1 und Maximum 2 sind durch Pfeile gekennzeichnet (vergl. Tab. 2)

Tabelle 25 Elutionsvolumina der Gelfiltrationssäule Superdex 200 des aufgereinigten NblR Proteins. Angegeben sind die Maxima mit den dazugehörigen Elutionsvolumina (V_e), deren Verhältnis V_e/V_0 und das berechnete Molekulargewicht.

Peak 1	Elutionsvolumen	V_e/V_0	berechnetes Molekulargewicht
Maximum 2	16,5 ml	1,96	26.690 Da
Peak 2			
Maximum 1	15,1 ml	1,79	56.600 Da
Maximum 2	16,5 ml	1,96	26.690 Da

3.9. NblR Protein im Wildtyp unter Standardwachstumsbedingungen und im Stickstoffmangel

Zur Analyse der Proteinexpression von NblR unter Stickstoffmangel wurde in den Wildtyp-Zellen Chlorose induziert und Proben direkt nach der Induktion, nach 6, 24 und 48 h Stickstoffmangel geerntet. Die Proben wurden für eine Western-Blot-Analyse gegen α -NblR verwendet (siehe Abschnitt C Material und Methoden).

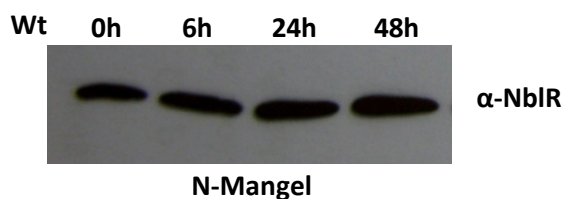


Abbildung 61 Western-Blot Analyse zum Nachweis von NblR während des Stickstoffmangels. Für die Western Blot Analyse wurden 10 μ g Gesamtprotein durch 12,5 %ige SDS-Page aufgetrennt.

Das NblR Protein konnte in Wildtyp Zellen unter Standardwachstumsbedingungen und Stickstoffmangel nachgewiesen werden (siehe Abb. 61). Die Menge an Protein blieb auch nach Stickstoffentzug konstant.

3.10. Unterschiede im Transkriptom der NblR-Mutante im Vergleich zum Wildtyp im Stickstoffmangel

Durch die Mikroarray-Analysen in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transkriptmenge des *nblR* Gens nach Initiation des Stickstoffmangels im Wildtyp und auch in der NtcA- und PipX-Mutante konstant blieb (siehe Tab. 26).

Durch die während dieser Arbeit durchgeführten Mikroarray-Analysen von Wildtyp und NblR-Mutante während Stickstoffchlorose (siehe Abschnitt B) konnten auch die Transkriptmenge weiterer bisher identifizierter Elemente des Nbl-Systems studiert

werden. Das Transkript des *nbIA* Genes wurde im Stickstoffmangel im Wildtyp erhöht. Die Induktion des *nbIA* Transkripts war in der NtcA- und der NblR-Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringer (siehe Tab. 26). Die Expression von *nbIA*, dem Schlüsselenzym des Phycobilisomenabbaus, ist abhängig von NtcA (Luque *et al.*, 2001).

Die Sensorkinase NblS ist ein wichtiger Regulator in der Anpassung des Photosyntheseapparates während Starklichtbedingungen und Nährstoffstress (Kappell *et al.*, 2006; van Waasbergen *et al.*, 2002). Durch die Mikroarray-Analyse konnte im Wildtyp und stärker in der NblR-Mutante eine Zunahme der Menge an *nbIS* Transkript nach 24 h Stickstoffentzug nachgewiesen werden, was, wie auch die vermehrte Expression von *psbAIII* (siehe oben), auf vermehrten Stress in der NblR-Mutante im Vergleich zum Wildtyp hinweist, da beide Gene (*nbIS*, *psbAIII*) durch erhöhte Stressbedingungen (Starklicht, UV-Licht, Nährstoffstress) induziert werden.

NblC ist ebenfalls an der komplexen Regulation des Chloroseprozesses beteiligt und besitzt Homologien zu anti-Sigma Faktoren (Sendersky *et al.*, 2005). Das Transkript von *nbIC* wurde im Wildtyp und in der NblR-Mutante nach Initiation des Stickstoffmangels induziert (siehe Tab. 26). In der NtcA-Mutante und der PipX-Mutante wurde eine geringe Zunahme des Transkripts von *nbIC* festgestellt. Die Expression von *nbIC* scheint jedoch nicht direkt NtcA-abhängig, da im Promotorbereich von *nbIC* keine NtcA-Bindestelle gefunden wurde.

Tabelle 26 Genen des nbl-Systems in *S. elongatus* Wildtyp im Vergleich zur NblR-Mutante, NtcA-Mutante und der PipX-Mutante nach 6 h und 24 h in Stickstoff-Chlorose. Die Tabelle enthält die errechneten Werte aus drei unabhängigen Experimenten inklusive eines *dye-swap* Experimentes. Die Fold change Werte wurden aus dem $2^{\text{M-value}}$ berechnet. Als signifikant induziert oder reprimiert wurden Gene gewertet, deren p-value $\leq 0,051$ und M-value $\geq +0,75$ bzw. $\leq -0,75$ (fett gedruckt).

JGI ORF	Gene	Annotated Protein Function	Fold change							
			Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄		Growth +NH ₄ vs. -NH ₄	
			WT		NblR		NtcA		PipX	
			6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h
2127	<i>nbIA</i>	<i>nbIA</i> protein	5,17	5,31	2,73	2,00	2,91	3,99	4,08	4,64
2305	<i>nbIR</i>	response regulator NblR	0,84	0,78	-	-	1,04	0,84	0,88	0,84
0924	<i>nbIS</i>	sensor kinase NblS	1,20	1,52	1,09	1,79	1,58	2,27	1,41	2,01
1823	<i>nbIB</i> (1)	phycocyanin alpha phycocyanobilin	0,63	0,46	0,55	0,47	0,44	0,33	0,43	0,38
1721	<i>nbIB</i> (2)	similar to phycocyanin alpha phycocyanobilin lyase	1,01	0,92	0,95	0,74	1,16	1,00	0,86	0,88
1438	<i>pmgA</i> (<i>nbIC</i>)	Photomixotrophic growth related protein A homolog	3,48	4,41	2,43	4,18	1,64	2,12	2,58	3,25

3.11. NblR-Bindungsanalysen an *nblA*- und *nsi5*-Promotor-DNA-Fragmente

In der NblR-Mutante konnte bisher gezeigt werden, dass die Expression von *nblA* im Vergleich zum Wildtyp während Stickstoff- und Schwefelmangel, sowie während der Starklichtexposition deutlich schwächer ist (diese Arbeit, siehe Abb. 57, Luque *et al.*, 2001; Schwarz & Grossman, 1998). Des Weiteren konnte durch diese Arbeit gezeigt werden, dass auch die starke Induktion des *nsi5* Gens im Wildtyp in der NblR-Mutante während Stickstoffmangel ausbleibt. Das NblR Protein zeigt große Homologien zu DNA-bindenden Response Regulatoren des Zwei-Komponentensystems. Deshalb wurde durch Gel-Retardierungs-Experimente und SPR-Analysen die Bindung von NblR an DNA untersucht. Als mögliche Ziel-DNA wurde der Promotorbereich von *nblA* und *nsi5* gewählt.

3.11.1. Gel-Retardierungsanalyse

Im ersten Ansatz wurde versucht durch Gel-Retardierungsanalysen eine Bindung von NblR an ein Promotor-DNA-Fragment von *nblA* (F-*nblA*) zu erreichen. Hierfür wurden radioaktiv markierte Fragmente eingesetzt. Sequenzvergleiche zeigte eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor NtcA im Promotorbereich von *nblA* (siehe Abschnitt A). Ein *glnA*-Promotor-DNA-Fragment (F-*glnA*) wurde als Positivkontrolle für die Bindung von NtcA verwendet. Eine Bindung von NtcA an F-*nblA* konnte nur durch Zugabe von α -Ketoglutarat beobachtet werden (siehe Abb. 62). Interessanterweise konnte in SPR-Analysen (siehe Abschnitt A, dieser Arbeit) die Bindung von NtcA an F-*nblA* bereits ohne Zusatz von α -Ketoglutarat nachgewiesen werden (siehe Abb. 16). Diese Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen Gel-Retardierung und SPR-Analyse zeigte sich bereits bei der Bindung an F-*glnA* (vergl. Abschnitt A).

Eine DNA-Bindung von NblR an F-*nblA* konnte weder in Abwesenheit noch in Anwesenheit von α -Ketoglutarat nachgewiesen werden (siehe Abb. 62). Eine gemeinsame Inkubation von NtcA und NblR führte zu keiner Verstärkung der Retardierung. Auch durch eine weitere Erhöhung der α -Ketoglutarat Konzentration auf 8 mM war keine Bindung von NblR an F-*nblA* nachzuweisen (Abbildung nicht gezeigt).

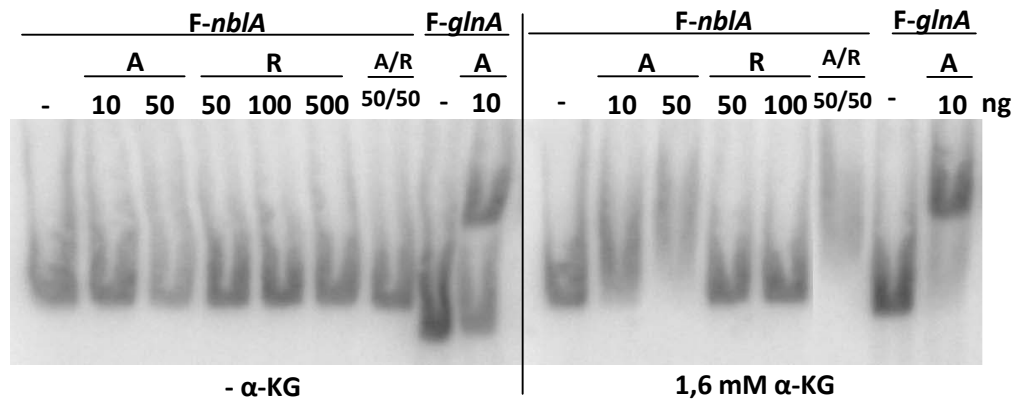


Abbildung 62 Gel-Retardierungsanalyse zur Bindung von NblR und NtcA an F-nblA. Der Reaktionsansatz enthielt 2 ng radioaktiv markierter DNA (*nblA* oder *glnA*), die oben angegebenen Mengen in ng an Protein (A) NtcA; (R) NblR wurden inkubiert in modifizierten Reaktionspuffer nach Luque *et al.* (2001). Der zweite Ansatz (rechte Seite) enthielt zusätzlich 1,6 mM α -Ketoglutarat (α -KG). Die negativ Kontrolle (-) enthielt kein Protein.

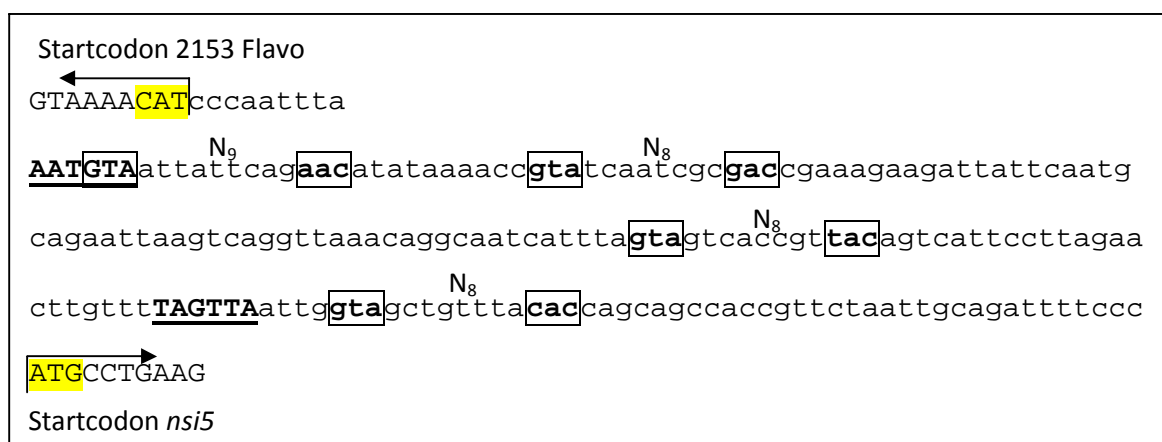


Abbildung 63 Nukleotidsequenz der *S. elongatus nsi5*- und Flavoprotein (2153) Promotorregion. Startcodon von *nsi5* und 2153 sind durch Pfeile markiert, putative NtcA-Bindestellen sind eingerahmt, putative -10 Boxen sind unterstrichen

Im Bereich des *nsi5* Promotors lies sich durch Sequenzuntersuchungen mehrere putative NtcA-Bindemotive identifizieren (siehe Abb. 63). In weiteren Gel-Retardierungsanalysen wurde die Bindung von NtcA und NblR an ein *nsi5* Promotor-DNA-Fragment (F-*nsi5*) untersucht.

Es konnte eine Bindung von NtcA an F-*nsi5* nachgewiesen werden (siehe Abb. 64). Bereits 5 ng NtcA Protein genügten, um die gesamte freie radioaktiv markierte DNA zu binden. Es konnte keine Bindung des NblR-Proteins an F-*nsi5* festgestellt werden (siehe Abb. 64). Auch durch die Zugabe von 5 mM $MgCl_2$ konnte keine Retardierung erreicht werden.

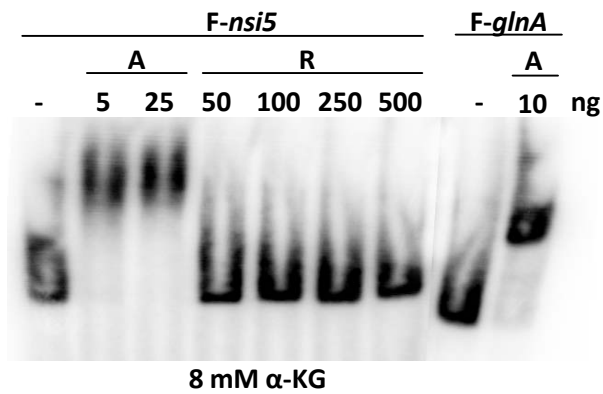


Abbildung 64 Gel-Retardierungsanalyse zur Bindung von NblR und NtcA an F-*nsi5*. Der Reaktionsansatz enthielt 2 ng radioaktiv markierter DNA (*nsi5* oder *glnA*), die angegebenen Mengen in ng an Protein (A) NtcA; (R) NblR sowie 8 mM α -Ketoglutarat (α -KG) wurden in modifiziertem Reaktionspuffer nach Luque *et. al.* (2001) inkubiert. Die negativ Kontrolle (-) enthielt kein Protein.

3.11.2. Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Biacore)

Bindungsanalysen mit NblR

Durch SPR-Analysen kann die Bindung von Proteinen an die DNA direkt beobachtet werden (siehe Abschnitt A, dieser Arbeit). In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass in den SPR-Analysen die Bindungen von NtcA an den *glnA*- sowie an den *nblA*-Promotorbereich im Vergleich zu Gel-Retardierungsanalysen weniger stark von α -KG stimuliert wird. Darüber hinaus zeigten die durchgeführten Studien, dass der NtcA-DNA Komplex je nach Pufferbedingung schneller oder langsamer dissoziiert. Eine Gel-Retardierung könnte sich somit aus der größeren Menge an gebundenem NtcA und langsamerer Dissoziation von NtcA von der DNA ergeben. Daher wurde versucht eine Bindung von NblR an die DNA durch SPR-Analyse nachzuweisen. Für die SPR-Experimente wurde das NblR-Protein frisch präpariert.

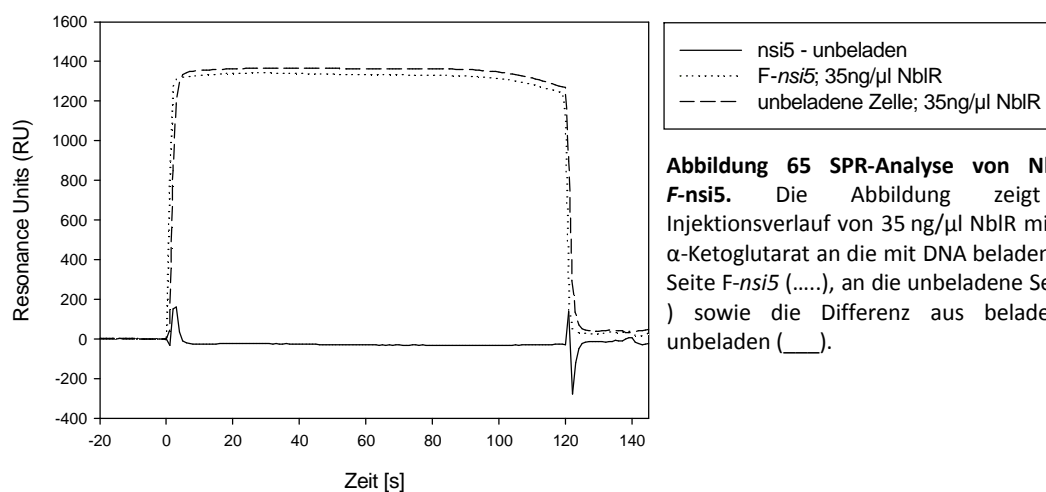


Abbildung 65 SPR-Analyse von NblR an F-*nsi5*. Die Abbildung zeigt den Injektionsverlauf von 35 ng/μl NblR mit 8 mM α -Ketoglutarat an die mit DNA beladene Chip-Seite F-*nsi5* (.....), an die unbeladene Seite (----) sowie die Differenz aus beladen und unbeladen (___).

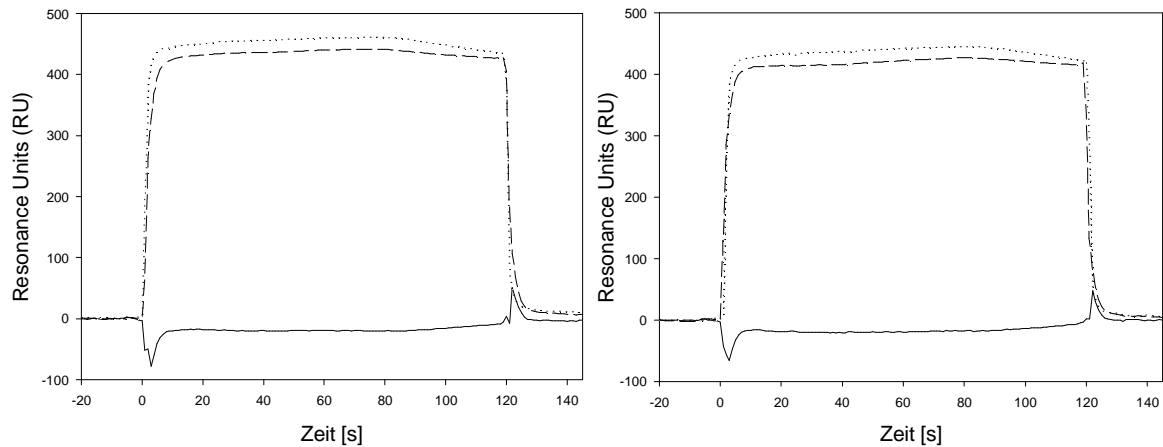


Abbildung 66 SPR-Analyse von NblR an F-*nblA*. Die Abbildung zeigt den Injektionsverlauf von 14 ng/μl NblR von F. 1 (linke Abb.) und F. 2 (rechte Abb.) mit 5 mM α -Ketoglutarat und 5 mM ATP an die mit DNA beladene Chip-Seite F-*nblA* (.....), an die unbeladene Seite (----) sowie die Differenz aus beladen und unbeladen (—).

Eine Bindung von NblR an F-*nsi5* konnte jedoch auch in SPR-Experimenten nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 65). Der Vergleich zur nicht mit DNA-beladenen Seite des Streptavidin Chips (Kontrolle) zeigte, dass auch hohe Proteinkonzentrationen von 35 ng/μl sowie die Zugabe von α -Ketoglutarat keine Bindung von NblR an F-*nsi5* zur Folge hatte. Auch an F-*nblA* konnte keine Bindung von NblR nachgewiesen werden (siehe Abb. 66). Weder die Proteinfraction von F. 1 oder F. 2 (siehe 3.7., Abschnitt C) noch die Zugabe von Effektormolekülen ATP und α -Ketoglutarat führte zur DNA-Bindung von NblR.

Response Regulatoren des Zwei-Komponenten-Systems werden oft durch Phosphorylierung aktiviert (Ashby & Houmard, 2006). In einem weiteren Ansatz wurde das NblR-Protein nach vorheriger Inkubation mit Berylliumfluorid injiziert. Dies führte bei NtrC, der Response Regulator des NtrB/NtrC Zwei-Komponenten-Systems von *E.coli* zur Nachahmung einer Phosphorylierung (Yan *et al.*, 1999). Doch auch durch den Berylliumfluorid-Ansatz konnte keine DNA-Bindung von NblR erreicht werden (Abbildung nicht gezeigt).

4. Diskussion

NblR ist ein Response Regulator der OmpR Familie und reagiert auf generellen Nährstoffstress und Starklicht-Exposition. Das einzige bisher bekannte Gen, dessen Transkription in der NblR-Mutante durch Nährstoff- und Starklicht-Stress nicht vollständig induziert wird, war *nblA* (Collier & Grossman, 1994; Luque *et al.*, 2001; Schwarz & Grossman, 1998).

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Reaktion der NblR-Mutante auf Stickstoffmangel und Schwefelmangel untersucht. Es konnte dabei gezeigt werden, dass auch die Transkription des *nsi5* Gens, ein spezifisch im Stickstoffmangel induziertes Gen, in der NblR-Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich schwächer induziert wurde. NblR regiert daher nicht nur auf den generellen Nährstoffmangel, sondern nimmt auch spezifisch Nährstoff abhängig Einfluss.

Auffällig war, dass sämtliche dem N-Metabolismus zugehörigen Gene, die unter der Kontrolle von NtcA stehen, deutlich geringere Transkriptmengen in der NblR-Mutante als im Vergleich zum Wildtyp nach Stickstoffentzug aufwiesen. Somit scheint in der NblR-Mutante das Signal des Stickstoffmangels nicht wahrgenommen zu werden. Im Stickstoffmangel wäre hier ein Einfluss von NblR auf die Aktivierung von NtcA oder die Aufhebung der Repression der Gene für die NtcA-abhängige Aktivierung möglich. Der Transkriptionsfaktor NtcA ist nur im Stickstoffmangel aktiv. Die NblR-Mutante zeigt einen eher pleiotropen Phänotyp. Die transkriptionelle Aktivierung von *nblA* ist in der NblR-Mutante außer bei Stickstoffmangel auch bei Schwefelmangel und bei Starklichtstress im Vergleich zum Wildtyp verringert, bei denen NtcA nicht relevant ist. Des Weiteren zeigten die Mikroarray-Daten, dass einige NtcA-abhängige Gene in der NblR-Mutante wie im Wt reguliert wurden. Ein direkter Einfluss von NblR nur auf NtcA scheint daher unwahrscheinlich.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Mikroarray-Analysen, Northern-Blot-Analysen und 2D-Gelelektrophorese mit S^{35} -Methionin markierten Proteinen konnte gezeigt werden, dass die Transkription und Expression der Gene *nsi5* und *nblA* sowohl in der NblR- als auch in der NtcA-Mutante im Stickstoffmangel im Vergleich zum Wildtyp

verringert ist. Im Promotorbereich des *nsi5* Genes konnte wie im Promotorbereich des *nblA* Genes, mehrere putative NtcA Bindestellen nachgewiesen werden. Die Bindung von NtcA an die Promotoren von *nsi5* und *nblA* wurde durch Gelshift und SPR-Experimente nachgewiesen. Somit konnte *nsi5* als ein neues, bisher unbekanntes NtcA-abhängiges Gen identifiziert werden.

Die Versuche zur DNA-Bindung von NblR zeigten jedoch, entgegen bisher veröffentlichter Ergebnisse (Luque *et al.*, 2001), dass NblR offensichtlich nicht an den Promotor des *nblA* Gens bindet. Auch eine Interaktion von NblR an den Promotorbereich des *nsi5* Gens konnte nicht nachgewiesen werden. Eine verkürzte Form des NblR Proteins, die nur aus der potentiellen DNA-bindenden Domäne bestand, zeigte in SPR-Experimenten eine schwache DNA-Bindung, die jedoch nicht spezifisch für die *nblA* Promotor-Region war (Wellen, 2008). NblR könnte demnach durchaus als Transkriptionsfaktor wirken, jedoch nicht spezifisch für das *nblA* und *nsi5* Gen. Möglicherweise interagiert jedoch NblR auch nicht direkt mit der DNA, sondern reguliert die Transkription über ein weiteres an der DNA angelagertes Protein.

In *S. elongatus* ist die Transkription von *nblA* während Stickstoffmangel nicht nur abhängig von NblR, sondern auch von NblC, einem Protein mit Homologien zu anti-sigma Faktor der SpoIIAB Familie, von NblS, einer Histidin Kinase, SipA einem Interaktionspartner von NblS, sowie von den globalen Stickstoffregulatoren NtcA und PipX (Espinosa *et al.*, 2006a; Luque *et al.*, 2001; Schwarz & Grossman, 1998; Sendersky *et al.*, 2005; van Waasbergen *et al.*, 2002). In der NblR-, NblC- und NblS-Mutante ist die Expression von *nblA* nach Stickstoff- und Schwefelentzug deutlich vermindert. In der NtcA-Mutante ist die Expression von *nblA* nur im Stickstoffmangel gestört. Ein Mechanismus zur Regulation der *nblA* Expression ist bisher noch unbekannt. Eine Abhängigkeit der Transkription allein von NblR scheint jedoch ausgeschlossen. Es wurden bisher fünf Promotoren für *nblA* identifiziert (P_{nblA1} - P_{nblA5}) (Luque *et al.*, 2001), drei NtcA-Bindestellen, sowie ein HLR1 Element, welches sich meist im Promotorbereich von NblS kontrollierten Genen befindet (Salinas *et al.*, 2007). SipA ist in der Lage mit dem C-terminus von NblS zu interagieren. Über das HLR1-Element wird eine NblS-SipA abhängige Repression vermutet (Kappell *et al.*, 2006; Salinas *et al.*, 2007). Für den Response Regulator RpaB konnte gezeigt werden, dass er am HLR1-Element binden

kann. Hanaoka *et al.* (2008) vermuten, dass RpaB unter normalen Lichtbedingungen als Repressor fungiert.

Die Aktivierung der *nblA* Transkription dürfte daher durch mehrere Faktoren beeinflusst werden. Unter Stickstoffmangelbedingungen könnte eine Aktivierung der *nblA* Transkription durch NtcA und NblR erfolgen. Dabei wäre eine Regulation durch NblR sowohl über eine direkte bisher noch nicht nachgewiesene DNA-Bindung als direkte Aktivator oder alternativ über eine direkte Protein-Protein Interaktion mit DNA-gebundenen Komponenten der Transkriptions-Maschinerie denkbar.

In den Mikroarray-Analysen konnte kein Gen identifiziert werden, dessen Transkription im Vergleich zum Wildtyp nur spezifisch in der NblR-Mutante ausblieb. Wurde ein Gen in der NblR-Mutante nicht induziert, so fehlte die Induktion auch in der NtcA- und/oder PipX-Mutante. Daher scheint eine Interaktion über weitere DNA-gebundene Komponenten der Transkriptions-Maschinerie wahrscheinlich, die von mehreren Faktoren u.a. auch von NtcA-abhängig sein könnten. Möglicherweise führt auch eine Interaktion von NblR mit RpaB zur Aufhebung der Repression von RpaB am HLR1-Element.

Es wird vermutet, dass der phosphorylierte Response Regulator RpaB unter Standardwachstumsbedingungen am HLR1-Element bindet und die Transkription reprimiert (Hanaoka & Tanaka, 2008; Seki *et al.*, 2007). Unter Starklichtbedingungen wird RpaB dephosphoryliert, löst sich von HLR1-Element und die Repression der Transkription wird aufgehoben. Die Phosphorylierung von RpaB erfolgt vermutlich durch die Histidin-Kinase NblS (Kappell & van Waasbergen, 2007). Da in *S. elongatus* SipA die Expression von *nblA* negativ beeinflusst, könnte SipA die Phosphorylierung von RpaB durch NblS begünstigen (Salinas *et al.*, 2007).

Für die vollständige *nblA*-Induktion werden die DNA-Sequenzen *upstream* und *downstream* von -44 des P_{nblA2} Promotors benötigt, was auch das HLR1-Element einschließt (Salinas *et al.*, 2007). Denkbar wäre daher auch eine positive Regulierung von NblR auf die *nblA*-Expression durch Dephosphorylierung von RpaB, was zur Ablösung von RpaB von der DNA führt und die Repression der *nblA*-Transkription aufhebt.

Somit würde unter Standardwachstumsbedingungen das durch NblS-SipA phosphorylierte RpaB Protein am HLR1-Element binden und die Transkription inhibieren. Bei Stickstoffmangel oder Starklichtstress würde durch Aktivierung von NblR RpaB

dephosphoryliert und die Expression von *nblA* erfolgen. In der NblR-Mutante würde RpaB weiterhin binden und die Expression von *nblA* wäre deutlich geringer als im Wildtyp.

Eine Aktivierung von Response Regulatoren wird in den meisten Fällen über eine Phosphorylierung erreicht. Die Mutation der hochkonservierten Phosphat-Akzeptorstelle D57 im NblR Protein führte jedoch zu keinem veränderten Phänotyp (Kato *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2008). Da eine Phosphorylierung von NblR auch *in vitro* durch Acetylphosphat nicht erreicht werden konnte, scheint eine Aktivierung von NblR über Phosphorylierung sehr unwahrscheinlich. Eine Phosphorylierung ist für die Aktivität eines Response Regulators auch nicht zwingend notwendig. So konnte gezeigt werden, dass der Response Regulator OmpR aus *E. coli* die Transkription von *ompC in vitro* unabhängig einer Phosphorylierung aktiviert (Tsuzuki *et al.*, 1994). In *Helicobacter pylori* wurde der Response Regulator HP1021 beschrieben, der wie NblR zur OmpR Familie der Response Regulatoren der Zwei-Komponenten-Systeme gehört und an der Zellteilung und Differenzierung beteiligt ist. Wie NblR ist auch bei HP1021 eine Phosphorylierung ausgeschlossen worden, die Funktion in der Aktivierung der Genexpression konnte jedoch gezeigt werden (Schär *et al.*, 2005).

Denkbar wäre eine Aktivierung von NblR durch Dimerisierung. Für viele Response Regulatoren konnte nachgewiesen werden, dass eine Dimerisierung für die transkriptionelle Aktivierung der Zielgene notwendig ist (Lewis *et al.*, 2002; Schaller *et al.*, 1995; Toro-Roman *et al.*, 2005). Für den Auxin Response Faktor konnte gezeigt werden, dass nur ein Dimer stabil an die DNA binden kann (Ulmasov *et al.*, 1999). Eine dimere Form von NblR könnte aufgrund der Gelfiltrationsanalyse des NblR-Proteins möglich sein. Die Gelfiltration deutete jedoch auch darauf hin, dass die dimere Form des NblR-Proteins sehr instabil war und bereits nach kurzer Lagerung in seine monomere Form zerfiel. Dadurch könnte die DNA-Bindung von NblR in der SPR-Analyse und Gel-Retardierungs-Experimenten fehlgeschlagen sein, obwohl frisch präpariertes NblR-Protein für die Analysen verwendet wurden.

In *Bacillus subtilis* wird die Expression von Genen für die Nitrat Respiration durch ein Zwei-Komponentensystem ResE (Kinase)-ResD (Response Regulator) aktiviert. Auch hier

ist ResD in der Lage, unabhängig einer Phosphorylierung die Transkription des ResDE Regulons zu aktivieren. Interessanterweise nimmt der Response Regulator ResD einen Sauerstoffmangel direkt wahr und aktiviert die Transkription (Geng *et al.*, 2004). Generelle Stress-Reaktionen werden intrazellulär durch Redox-Signale ausgelöst. Eine Regulation des Response Regulators NblR durch den Redox-Zustand wäre denkbar, da auch die steady-state mRNA Menge der PSII und PSI Reaktions-Zentren auf den Redox-Zustand des PQ-Pools reagieren (Li & Sherman, 2000; O'Gara *et al.*, 1998; Pfannschmidt *et al.*, 2001). In den Mikroarray-Analysen unter Standardwachstumsbedingungen waren in der NblR-Mutante auch besonders die Gene des Photosyntheseapparates fehlreguliert. Möglicherweise tragen Redox-Signale zu einer Stabilisierung eines dimeren NblR-Proteins bei, wie dies auch für den Repressor CrtJ aus *Rhodobacter sphaeroides* beschrieben wird (Bauer, 2003). CrtJ bildet nur unter oxidierenden Wachstumsbedingungen eine Tetramere Struktur und ist nur so in der Lage an die DNA zu binden und die Transkription von Photosynthesegenen zu regulieren.

Im Transkriptom der NblR-Mutante wurde unter Standardwachstumsbedingungen festgestellt, dass besonders Gene des Photosyntheseapparates fehlreguliert waren. Insbesondere waren in der NblR-Mutante die Transkripte der PS I Untereinheit PsaK (*psaK1* und *psaK2*) im Vergleich zum Wildtyp deutlich erniedrigt. In *Synechocystis* konnte gezeigt werden, dass PsaK2 für den Energietransfer von den Phycobilisomen auf das PS I, sowie für die schnelle *state transition* benötigt wird (Fujimori *et al.*, 2005). Auch in der NblR-Mutante war bereits unter Standardwachstumsbedingungen die *state transition* verringert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch in *S. elongatus* PsaK für die *state transition* benötigt wird und in der NblR-Mutante schon bei Standardwachstumsbedingungen Defekte in der Anpassung des Photosyntheseapparates auftreten.

Der Phycobilisomen-Abbau ist abhängig von der Expression von *nblA*. NblA bindet mit der C-terminalen Helix an Phycocyanin und mit der N-terminalen Helix an ClpC einer Clp Protease (Bienert *et al.*, 2006; Karradt *et al.*, 2008). Es wird daher vermutet, dass NblA als ein Adapter-Protein zwischen Phycobilisom und ClpC/ClpP Komplex fungiert und dadurch den Abbauprozess des Phycobilisomen einleitet. Der Abbau der Phycobilisomen

erfolgt nach einem geregelten Prozess, in dem zuerst die äußeren Stäbchen, bestehend aus Phycocyanin abgebaut werden (Collier & Grossman, 1992; Yamanaka & Glazer, 1980). Während dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der NblR-Mutante der gesamte Prozess der Chlorose gestört ist. Neben dem fehlenden Abbau der Phycobilisomen, aufgrund der verminderten Menge an NblA, produziert die NblR-Mutante in den ersten Stunden nach Stickstoffentzug weiterhin Phycobiliproteine. Die Transkripte von *cpc* (Phycocyanin) und *apc* (Allophycocyanin), der Bestandteile der Phycobilisomen wurden im Wildtyp nach Stickstoffentzug drastisch reduziert und verblieben auf etwa 5 bis 10 % des Ausgangswertes in Stickstoff-gesättigten Zellen. Die Neusynthese von Phycobilisomen wurde im Wildtyp sofort nach Stickstoffentzug gestoppt, was auf die verminderte Proteinstabilität durch NblA zurückzuführen sein muss, da nach Stickstoffentzug noch *cpc* und *apc* Transkript vorhanden ist. Die Produktion von Phycobilisomen wird während Nährstoffmangel auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene blockiert. Eine geringere PBS-Protein-Synthese findet jedoch auch nach lang anhaltender Chlorose statt (Görl *et al.*, 1998; Sauer *et al.*, 2001). Interessanterweise war nur die Regulation von *cpc* und nicht von *apc* in der NblR-Mutante gestört. Die Transkription von *cpc* wurde in den ersten Stunden nach Stickstoffentzug in der NblR-Mutante nicht vermindert. Eine mögliche negative Feedback-Reaktion von Phycocyanin Degradationsprodukten auf die Transkription von *cpc* wäre denkbar, wie es auch für die Abbauprodukte des D1 Proteins auf die Transkription des *psbAI* Genes beschrieben wird (Stelljes & Koenig, 2007), da NblA in *S. elongatus* Wildtyp an die Phycocyanin Untereinheit bindet und dort den Abbau der Phycobilisomen einleitet und der Abbau in der NblR-Mutante nicht stattfindet.

Die Zellen der NblR-Mutante sterben nach Entzug der Stickstoffquelle innerhalb von 24 bis 30 h ab. Alle anderen bisher beschriebenen nbl-Mutanten überleben einen Nährstoffmangel deutlich länger (Collier & Grossman, 1994; Sendersky *et al.*, 2005; van Waasbergen *et al.*, 2002). Neben dem fehlenden Abbau der Phycobilisomen müssen daher weitere Faktoren zu dem schnellen Absterben der NblR-Zellen führen.

Der Abbau der Phycobilisomen reduziert die absorbierte Lichtmenge auf dem Photosyntheseapparat, da die Anregungsenergie für anabolische Prozesse durch den Stickstoffmangel nicht mehr vollständig verwendet werden kann. Bleibt der Abbau der

Phycobilisomen aus, müsste eine Reduktion des photosynthetischen Elektronentransportes zunehmen und somit zu einem stark reduzierten PQ-Pool führen. Während dem Verlauf der Chlorose verringert die NblR-Mutante drastisch die Transkription der ATP Synthase sowie NAD Dehydrogenase, beides Bestandteile der Respiration und des Elektronentransportes, vermutlich aufgrund eines stark reduzierten PQ-Pools.

Die Gene, die für den NDH-1L Komplex kodieren, der an der Respiration und dem zyklischen Elektronentransport um PS I beteiligt ist, sowie die Gene die für Proteine des Photosyntheseapparates kodieren, wurden in der NblR-Mutante sehr stark reprimiert was dann zu einem schnellen Verlust der photosynthetischen Aktivität führt und somit auch eine Reduktion der ATP-Generation nach sich zieht. Wellen (2008) konnte zeigen, dass 24 h nach Stickstoffmangel ein drastischer Abfall der ATP Konzentration in den NblR Zellen stattfindet.

Es wird vermutet, dass die photosynthetische Restaktivität in chlorotischen Zellen für die Generation von ATP sorgt (Sauer *et al.*, 2001). Mit dem Verlust des photosynthetischen Elektronentransportes und folglich der ATP-Bildung verliert die Mutante die notwendige Energie, um ein Überleben im Stickstoffmangel zu ermöglichen und eine Regeneration der Zellen nach Stickstoffgabe einzuleiten. Der zusätzliche Energieverbrauch durch die Synthese von Phycobilisomen während dem Stickstoffmangel, der fehlenden Proteolyse der Phycobilisomen durch verringerte NblA Expression, sowie die verringerte Expression der Gene die für Proteine kodieren, die an der Aufnahme und Metabolisierung von alternativen Stickstoffquellen beteiligt sind, verstärken den Stickstoffmangel und den Energieverlust in der NblR-Mutante. In der NblR-Mutante wird nach Stickstoffentzug weiterhin Energie für den Stoffwechsel verbraucht, die jedoch durch die verringerte Aktivität der Photosynthese nicht nachgeliefert werden kann. Vermutlich führt dies zum vollständigen Energieverlust der NblR-Zellen, was wiederum das Absterben der Zellen beschleunigt.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bindung von NtcA an DNA nicht nur durch Gel-Retardierungs-Experimente, sondern auch durch SPR-Bindungsstudien nachgewiesen werden kann. Durch die SPR-Bindungsstudien von NtcA konnten spezifische NtcA-abhängige Promotoren von unspezifischer DNA aufgrund der Affinität und Kinetik der Bindungseigenschaften von NtcA unterschieden werden. Die Bindung von NtcA an die DNA ist abhängig vom NtcA-Bindemotiv und den umgebenden Sequenzen. Die Wirkung von α -KG auf die NtcA-DNA-Bindung hängt von der Sequenzenumgebung des NtcA-Bindemotivs ab..

Durch die Transkriptom-Daten konnte die erste experimentelle Analyse des gesamten NtcA-Regulons in einem Cyanobakterium erstellt werden. Bereits unter Ammoniumwachstumsbedingungen traten Unterschiede im Transkriptom zwischen Wildtyp und NtcA-Mutante auf. Im Stickstoffmangel waren in der NtcA-Mutante all die Gene nicht induziert, die für Proteine kodieren, die an der Aufnahme (z.B. *amtB*, *amt1*) und Metabolisierung von Stickstoffverbindungen (z.B. *nirA*, *nirB*, *glnA*, *glnN*) beteiligt sind. Zusätzlich zu den bereits bekannten NtcA-abhängigen Genen konnten 20 weitere, bisher nicht beschriebene NtcA-abhängig induzierte Gene entdeckt werden. Für die im Wildtyp nach Stickstoffmangel am höchsten induzierten Gene *nsi5*, *merR*, *2150*, *2149* und *2148*, die als polycistronische mRNA transkribiert werden, konnte ein NtcA-Bindemotiv funktionell nachgewiesen werden.

Nach Stickstoffentzug kam es in der NtcA-Mutante zur Hyperrepression der Gene die für Proteine des PS I und PS II, der Bestandteile der Phycobilisomen (*apc*, *cpc*), der ATP Synthase sowie für Proteine des Elektronentransport in der Photosynthese Cytochrom, Plastocyanin und für Proteine des NDH-1L-Komplexes kodieren. Da diese Gene keine NtcA-Bindemotive enthalten, handelt es sich vermutlich um sekundäre Folgen der *ntcA* Mutation.

In der PipX-Mutante waren die Transkripte aller NtcA-abhängig induzierten Gene im Vergleich zum Wt deutlich erniedrigt. Dies bestätigt die Annahme, dass PipX für die volle

Aktivierung von NtcA benötigt wird. Die durch NtcA reprimierten Gene waren hingegen in der PipX-Mutante nicht beeinträchtigt.

In einer NblR-defizienten Mutante ist der gesamte Prozess der Chlorose gestört. Neben dem fehlenden Abbau der Phycobilisomen (PBS), bedingt durch die ausbleibende NblA Bildung, konnte in den ersten Stunden nach Stickstoffentzug noch eine Neusynthese von Phycobiliproteinen nachgewiesen werden, deren Synthese im Wt sofort nach Stickstoffentzug gestoppt wurde.

Alle in der NblR-Mutante nicht induzierten Gene waren in der NtcA-Mutante ebenfalls nicht induziert. Die durch NtcA reprimierten Gene waren hingegen in der NblR-Mutante nicht beeinträchtigt.

Die Gene, die für Proteine des NDH-1L Komplexes kodieren, der an der Respiration und dem zyklischen Elektronentransport um PS I beteiligt ist, sowie die Gene, die für Proteine des PS I und PS II kodieren, wurden in der NblR-Mutante im Stickstoffmangel sehr stark reprimiert. Zusätzlich wurden die Transkripte der Proteine der ATP Synthase in der NblR-Mutante nach Stickstoffentzug drastisch reprimiert.

Die NblR-Mutante stirbt innerhalb von 24 bis 48 h nach Stickstoffentzug ab. Mit dem Verlust der Elektronentransportrate und photosynthetischen Aktivität sowie der ATP-Generation verliert die NblR-Mutante die notwendige Energie um ein Überleben im Stickstoffmangel zu ermöglichen und eine Regeneration der Zellen nach Stickstoffgabe einzuleiten.

Neben *nblA* konnte mit *nsi5* ein weiteres in der NblR-Mutante fehlreguliertes Gen identifiziert werden, dass im Wildtyp spezifisch im Stickstoffmangel induziert wird. Eine direkte DNA-Bindung von NblR konnte jedoch weder an den *nblA*- noch an den *nsi5*-Promotor nachgewiesen werden. Möglicherweise interagiert NblR mit anderen DNA-gebundenen Komponenten der Transkriptions-Maschinerie.

6. Literaturverzeichnis

- Aichi, M. & Omata, T. (1997).** Involvement of NtcB, a LysR family transcription factor, in nitrite activation of the nitrate assimilation operon in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology* **179**, 4671-4675.
- Aichi, M., Takatani, N. & Omata, T. (2001).** Role of NtcB in activation of nitrate assimilation genes in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology* **185**, 2582-2591.
- Aldehni, F. M., Sauer, J., Spielhaupter, C., Schmid, R. & Forchhammer, K. (2003).** Signal Transduction Protein PII Is Required for NtcA-Regulated Gene Expression during Nitrogen Deprivation in the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* Strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology* **185**, 2582-2591.
- Aldehni, F. M. (2005).** Studien zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NtcA in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. In *Institut für Mikro- und Molekularbiologie*. Gießen: Justus-Liebig-Universität.
- Aldehni, F. M. & Forchhammer, K. (2006).** Analysis of a non-canonical NtcA-dependent promoter in *Synechococcus elongatus* and its regulation by NtcA and PII. *Archives of Microbiology* **184**, 378-386.
- Allen, M. M. & Smith, A. J. (1969).** Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Archives of Microbiology* **69**, 114-120.
- Anderson, P. M., Sung, Y.-c. & James A. Fuchs (1990).** The cyanase operon and cyanate metabolism. *FEMS Microbiology Letters* **87**, 247-252.
- Arcondeguy, T., Jack, R. & Merrick, M. (2001).** PII Signal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**, 80-105.
- Ashby, M. K. & Mullineaux, C. W. (1999).** Cyanobacterial *ycf27* gene products regulate energy transfer from phycobilisomes to photosystems I and II. *FEMS Microbiology Letters* **181**, 253-260.
- Ashby, M. K. & Houmard, J. (2006).** Cyanobacterial Two-Component Proteins: Structure, Diversity, Distribution, and Evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 472-509.
- Badger, M. R., Price, G. D., Long, B. M. & Woodger, F. J. (2006).** The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *J Exp Bot* **57**, 249-265.
- Barker-Astrom, K., Schelin, J., Gustafsson, P., Clarke, A. K. & Campbell, D. A. (2005).** Chlorosis during nitrogen starvation is altered by carbon dioxide and temperature and is mediated by ClpP1 protease in *Synechococcus elongatus*. *Archives of Microbiology* **183**, 66-69.
- Battchikova, N. & Aro, E.-M. (2007).** Cyanobacterial NDH-1 complexes: multiplicity in function and subunit composition. *Physiologia Plantarum* **131**, 22-32.
- Bauer, C. (2003).** Redox and light regulation of gene expression in photosynthetic prokaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **358**, 147-154.

Berkovitch, F., Nicolet, Y., Wan, J. T., Jerrett, J. T. & Drennan, C. L. (2004). Crystal structure of biotin synthase, an s-adenosylmethionine-dependent radical enzyme. *Science* **303**, 76-79.

Biacore, A. (2003). *Biacore Basics Introduction to SPR-Analysis*.

Bienert, R., Baier, K., Volkmer, R., Lockau, W. & Heinemann, U. (2006). Crystal Structure of NblA from *Anabaena* sp. PCC 7120, a Small Protein Playing a Key Role in Phycobilisome Degradation. *J Biol Chem* **281**, 5216-5223.

Bilwes, A., Alex, L., Crane, B. & Simon, M. (1999). Structure of CheA, a Signal-Transducing Histidine Kinase. *Cell* **96**, 131-141.

Bogorad, L. (1975). Phycobiliproteins and Complementary Chromatic Adaptation. *Annual Reviews in Plant Physiology* **26**, 369-401.

Brasier, M., Green, O., Lindsay, J. & Steele, A. (2004). Earth's Oldest (~ 3.5 Ga) Fossils and the Early Eden Hypothesis: Questioning the Evidence. *Origins of Life and Evolution of Biospheres (Formerly Origins of Life and Evolution of the Biosphere)* **34**, 257-269.

Bryant, D. (1994). *The Molecular Biology of Cyanobacteria*: Kluwer Academic Publishers.

Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & M., S. J. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-378.

Burillo, S., Luque, I., Fuentes, I. & Contreras, A. (2004). Interactions between the Nitrogen Signal Transduction Protein PII and N-Acetyl Glutamate Kinase in Organisms That Perform Oxygenic Photosynthesis. *Journal of Bacteriology* **186**, 3346-3354.

Burkovski, A. (2007). Nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*: proteins, mechanisms, signals. *J Microbiol Biotechnol* **17**, 187-194.

Busby, S. & Ebright, R. H. (1997). Transcription activation at Class II CAP-dependent promoters. *Molecular Microbiology* **23**, 853-859.

Cai, Y. & Wolk, C. (1997). Nitrogen deprivation of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 elicits rapid activation of a gene cluster that is essential for uptake and utilization of nitrate. *Journal of Bacteriology* **179**, 258-266.

Campbell, D., Eriksson, M.-J., Öquist, G., Gustafsson, P. & Clarke, A. K. (1998). The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 364-369.

Cavalier-Smith, T. (1975). The origin of nuclei and of eukaryotic cells. *Nature* **256**, 463-468.

Chang, C. & Stewart, R. (1998). The Two-Component System. Regulation of Diverse Signaling Pathways in Prokaryotes and Eukaryotes. *Plant Physiology* **117**, 723-731.

Coll, M., Frederick, C. A., Wang, A. H. & Rich, A. (1987). A bifurcated hydrogen-bonded conformation in the d(A.T) base pairs of the DNA dodecamer d(CGCAATTTGCG) and its complex

with distamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 8385-8389.

Collier, J. L. & Grossman, A. R. (1992). Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *Journal of Bacteriology* **174**, 4718-4726.

Collier, J. L. & Grossman, A. R. (1994). A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria. *The EMBO Journal* **13**, 1039-1047.

Cozens, A. & Walker, J. (1987). The organization and sequence of the genes for ATP synthase subunits in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. Support for an endosymbiotic origin of chloroplasts. *J Mol Biol* **194**, 359-383.

Crespo, J. L., Garcia-Dominguez, M. & Florencio, F. (1998). Nitrogen control of the *glnN* gene that codes for GS type III, the only glutamine synthetase in the cyanobacterium *Pseudanabaena* sp. PCC 6903. *Molecular Microbiology* **30**, 1101-1112.

Dolganov, N. & Grossman, A. R. (1999). A Polypeptide with Similarity to Phycocyanin alpha - Subunit Phycocyanobilin Lyase Involved in Degradation of Phycobilisomes. *Journal of Bacteriology* **181**, 610-617.

Espie, G. S., Jalali, F., Tong, T., Zagal, N. J. & So, A. K.-C. (2007). Involvement of the *cynABDS* Operon and the CO₂-Concentrating Mechanism in the Light-Dependent Transport and Metabolism of Cyanate by Cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* **189**, 1013-1024.

Espinosa, J., Forchhammer, K., Burillo, S. & Contreras, A. (2006a). Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA. *Molecular Microbiology* **61**, 457-469.

Espinosa, J., Fuentes, I., Burillo, S., Rodriguez-Mateos, F. & Contreras, A. (2006b). SipA, a novel type of protein from *Synechococcus* sp. PCC 7942, binds to the kinase domain of NblS. *FEMS Microbiology Letters* **254**, 41-47.

Espinosa, J., Forchhammer, K. & Contreras, A. (2007). Role of the *Synechococcus* PCC 7942 nitrogen regulator protein PipX in NtcA-controlled processes. *Microbiology* **153**, 711-718.

Flores, E., Guerrero, M. & Losada, M. (1980). Short-term ammonium inhibition of nitrate utilization by *Anacystis nidulans* and other cyanobacteria. *Archives of Microbiology* **128**, 137-144.

Flores, E. & Herrero, A. (1994). Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Edited by D. Bryant. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Flores, E., Muro-Pastor, A. & Herrero, A. (1999). Cyanobacterial nitrogen assimilation genes and NtcA-dependent control of gene expression. *The phototrophic prokaryotes Plenum Publishing Corporation, New York, NY*, 463-477.

Flores, E., Frías, J. E., Rubio, L. & Herrero, A. (2005). Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. *Photosynthesis research* **83**, 117-133.

- Forchhammer, K. & Tandeau de Marsac, N. (1994).** The PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. *Journal of Bacteriology* **176**, 84-91.
- Forchhammer, K. & Tandeau de Marsac, N. (1995).** Functional analysis of the phosphoprotein P II (glnB gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology* **177**, 2033-2040.
- Forchhammer, K. & Hedler, A. (1997).** Phosphoprotein P_{II} from Cyanobacteria. *European Journal of Biochemistry* **244**, 869-875.
- Forchhammer, K. (2004).** Global carbon/nitrogen control by P_{II} signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. *FEMS Microbiology Reviews* **28**, 319-333.
- Forchhammer, K. (2008).** PII signal transducers: novel functional and structural insights. *Trends in Microbiology* **16**, 65-72.
- Frías, J., Flores, E. & Herrero, A. (1997).** Nitrate assimilation gene cluster from the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology* **179**, 477-486.
- Frías, J., Flores, E. & Herrero, A. (2000).** Activation of the *Anabaena nir* operon promoter requires both NtcA (CAP family) and NtcB (LysR family) transcription factors. *Molecular Microbiology* **38**, 613-625.
- Fujimori, T., Hihara, Y. & Sonoike, K. (2005).** Psak2 Subunit in Photosystem I Is Involved in State Transition under High Light Condition in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* **280**, 22191-22197.
- García-Domínguez, M., Reyes, J. & Florencio, F. (1999).** Glutamine synthetase inactivation by protein-protein interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 7161-7166.
- García-Domínguez, M. & Florencio, F. J. (1997).** Nitrogen availability and electron transport control the expression of *glnB* gene (encoding PII protein) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Molecular Biology* **35**, 723-734.
- García-Domínguez, M., Reyes, J. C. & Florencio, F. J. (2000).** NtcA represses transcription of *gifA* and *gifB*, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular Microbiology* **35**, 1192-1201.
- Geng, H., Nakano, S. & Nakano, M. M. (2004).** Transcriptional Activation by *Bacillus subtilis* ResD: Tandem Binding to Target Elements and Phosphorylation-Dependent and -Independent Transcriptional Activation. *Journal of Bacteriology* **186**, 2028-2037.
- Georgakopoulos, T. & Thireos, G. (1992).** Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *EMBO Journal* **11**, 4145-4152.
- Glazer, A. (1984).** Phycobilisome: a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochimica et biophysica acta* **768**, 29-51.

- Golden, S., Brusslan, J. & Haselkorn, R. (1986).** Expression of a family of psbA genes encoding a photosystem II polypeptide in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *The EMBO Journal* **5**, 2789-2798.
- Görl, M., Sauer, J., Baier, T. & Forchhammer, K. (1998).** Nitrogen-starvation-induces chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942: adaptation to long-term survival. *Microbiology* **144**, 2449-2458.
- Grodberg, J. & Dunn, J. J. (1988).** ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *Journal of Bacteriology* **170**, 1245-1253.
- Grossman, A. (1990).** Chromatic adaptation and the events involved in phycobilisome biosynthesis. *Plant, Cell and Environment* **13**, 651-666.
- Grossman, A., Schaefer, M., Chiang, G. & Collier, J. (1993a).** The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiological Reviews* **57**, 725-749.
- Grossman, A. R., Schaefer, M., Chiang, G. & Collier, J. L. (1993b).** Environmental Effects on the Light-Harvesting Complex of Cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* **175**, 575-582.
- Guerrero, M. G., Vega, J. M. & Losada, M. (1981).** The Assimilatory Nitrate-Reducing System and its Regulation. *Annual Review of Plant Physiology* **32**, 169-204.
- Gunasekera, A., Ebright, Y. & Ebright, R. (1992).** DNA sequence determinants for binding of the *Escherichia coli* catabolite gene activator protein. *J Biol Chem* **267**, 14713-14720.
- Hanahan, D. (1985).** Techniques for transformation of *Escherichia coli*. *DNA Cloning: A Practical Approach* **1**, 109-135.
- Harano, Y., Suzuki, I., Maeda, S., Kaneko, T., Tabata, S. & Omata, T. (1997).** Identification and nitrogen regulation of the cyanase gene from the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology* **179**, 5744-5750.
- Harrison, S. C. & Aggarwal, A. K. (1990).** DNA Recognition by Proteins with the Helix-Turn-Helix Motif. *Annual Review of Biochemistry* **59**, 933-969.
- Heinemann, U., Engels, D., Bürger, S., Kiziak, C., Mattes, R. & Stolz, A. (2003).** Cloning of a nitrilase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 and heterologous expression and characterization of the encoded protein. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 4359-4366.
- Heinrich, A., Maheswaran, M., Ruppert, U. & Forchhammer, K. (2004).** The *Synechococcus elongatus* P_{II} signal transduction protein controls arginine synthesis by complex formation with N-acetyl-l-glutamate kinase. *Molecular Microbiology* **52**, 1303-1314.
- Heinrich, A., Woyda, K., Brauburger, K., Meiss, G., Detsch, C., Stulke, J. & Forchhammer, K. (2006).** Interaction of the Membrane-bound GlnK-AmtB Complex with the Master Regulator of Nitrogen Metabolism TnrA in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **281**, 34909-34917.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A. & Flores, E. (2001).** Nitrogen Control in Cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* **183**, 411-425.

- Hesketh, A., Fink, D., Gust, B., Rexer, H. U., Scheel, B., Chater, K., Wohlleben, W. & Engels, A. (2002). The GlnD and GlnK homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2) are functionally dissimilar to their nitrogen regulatory system counterparts from enteric bacteria. *Mol Microbiol* **46**, 319-330.
- Hwang, I., Chen, H.-C. & Sheen, J. (2002). Two-Component Signal Transduction Pathways in Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**, 500-515.
- Ireton, G., McDermott, G., Black, M. & Stoddard, B. (2002). The structure of *Escherichia coli* cytosine deaminase. *Journal of Molecular Biology* **315**, 687-697.
- Irmeler, A., Sanner, S., Dierks, H. & Forchhammer, K. (1997). Dephosphorylation of the phosphoprotein P_{II} in *Synechococcus* PCC 7942: identification of an ATP and 2-oxoglutarate-regulated phosphatase activity. *Molecular Microbiology* **26**, 81-90.
- Jaggi, R., Ybarlucea, W., Cheah, E., Carr, P., Edwards, K., Ollis, D. & Vasudevan, S. (1996). The role of the T-loop of the signal transducing protein PII from *Escherichia coli*. *FEBS letters* **391**, 223-228.
- Jensen, P. E., Gilpin, M., Knoetzel, J. & Scheller, H. V. (2000). The PSI-K Subunit of Photosystem I Is Involved in the Interaction between Light-harvesting Complex I and the Photosystem I Reaction Center Core. *J Biol Chem* **275**, 24701-24708.
- Jiang, F., Wisén, S., Widersten, M., Bergman, B. & Mannervik, B. (2000). Examination of the transcription factor NtcA-binding motif by in vitro selection of DNA sequences from a random library. *Journal of Molecular Biology* **301**, 783-793.
- Kaneko, T., Matsubayashi, T., Sugita, M. & Sugiura, M. (1996). Physical and gene maps of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC6301 genome. *Plant Molecular Biology* **31**, 193-201.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H. & other authors (1996). Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. II. Sequence Determination of the Entire Genome and Assignment of Potential Protein-coding Regions. *DNA Res* **3**, 109-136.
- Kappell, A., Bhaya, D. & van Waasbergen, L. (2006). Negative control of the high light-inducible *hliA* gene and implications for the activities of the NblS sensor kinase in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *Archives of Microbiology* **186**, 403-413.
- Kappell, A. & van Waasbergen, L. (2007). The response regulator RpaB binds the high light regulatory 1 sequence upstream of the high-light-inducible *hliB* gene from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Archives of Microbiology* **187**, 337-342.
- Karradt, A., Sobanski, J., Mattow, J., Lockau, W. & Baier, K. (2008b). NblA, a Key Protein of Phycobilisome Degradation, Interacts with ClpC, a HSP100 Chaperone Partner of a Cyanobacterial Clp Protease. *J Biol Chem* **283**, 32394-32403.
- Kato, H., Chibazukura, T. & Yoshikawa, H. (2008). NblR Is a Novel One-Component Response Regulator in the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Bioscience Biotechnol Biochem* **72**, 1072-1079.

- Kloft, N. & Forchhammer, K. (2005). Signal transduction protein PII phosphatase PphA is required for light-dependent control of nitrate utilization in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* **187**, 6683-6690.
- Kloft, N., Rasch, G. & Forchhammer, K. (2005). Protein phosphatase PphA from *Synechocystis* sp. PCC 6803: the physiological framework of PII-P dephosphorylation. *Microbiology* **151**, 1275-1283.
- Klughammer, B., Sültemeyer, D., Badger, M. R. & Price, G. D. (1999). The involvement of NAD(P)H dehydrogenase subunits, NdhD3 and NdhF3, in high-affinity CO₂ uptake in *Synechococcus* sp. PCC7002 gives evidence for multiple NDH-1 complexes with specific roles in cyanobacteria. *Molecular Microbiology* **32**, 1305-1315.
- Koksharova, O. A., Brandt, U. & Cerff, R. (2004). The *gap1* Operon of the Cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942 Carries a Gene Encoding Glycogen Phosphorylase and Is Induced under Anaerobic Conditions *Microbiology* **73**, 326-329.
- Kolb, I., Busby, S., Buc, H., Garges, S. & Adhya, S. (1993). Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annual Review of Biochemistry* **62**, 749-795.
- Kroghmann, D. W. (1973). Photosynthetic Reactions and Components of Thylakoids. In *The Biology of Blue-green Algae*, pp. 80-98. Edited by N. Carr & B. Whitton: Oxford, Blackwell Scientific.
- Kuhlemeier, C. J., Thomas, A. A., van den Ende, A., van Leen, R. W., Borrias, W. E., van den Hondel, C. A. & van Arkel, G. A. (1983). A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Plasmid* **10**, 156-163.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, H.-M., Vazquez-Bermudez, M. F. & de Marsac, N. T. (1999). The Global Nitrogen Regulator NtcA Regulates Transcription of the Signal Transducer PII (*GlnB*) and Influences Its Phosphorylation Level in Response to Nitrogen and Carbon Supplies in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology* **181**, 2697-2702.
- Lee, H.-M., Flores, E., Forchhammer, K., Herrero, A. & Marsac, N. T. d. (2000a). Phosphorylation of the signal transducer P_{II} protein and an additional effector are required for the P_{II}-mediated regulation of nitrate and nitrite uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *European Journal of Biochemistry* **267**, 591-600.
- Lewis, R., Scott, D., Brannigan, J., Ladds, J., Cervin, M., Spiegelman, G., Hoggett, J., Barák, I. & Wilkinson, A. (2002). Dimer formation and transcription activation in the sporulation response regulator Spo0A. *Journal of Molecular Biology* **316**, 235-245.
- Li, H. & Sherman, L. A. (2000). A Redox-Responsive Regulator of Photosynthesis Gene Expression in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* **182**, 4268-4277.
- Lindell, D., Padan, E. & Post, A. (1998). Regulation of ntcA Expression and Nitrite Uptake in the Marine *Synechococcus* sp. Strain WH 7803. *Journal of Bacteriology* **180**, 1878-1886.

Lönneborg, A., Lind, L. K., Kalla, S. R., Gustafsson, P. & Öquist, G. (1985). Acclimation Processes in the Light-Harvesting System of the Cyanobacterium *Anacystis nidulans* following a Light Shift from White to Red Light. *Plant Physiol* **78**, 110-114.

Lottspeich, F., Zorbas, H. & Engelhard, M. (2006). *Bioanalytik*: Spektrum, Akad. Verl.

Luque, I., Herrero, A., Flores, E. & Madueno, F. (1992). Clustering of genes involved in nitrate assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Molecular and General Genetics* **232**, 7-11.

Luque, I., Flores, E. & Herrero, A. (1993). Nitrite reductase gene from *Synechococcus* sp. PCC 7942: homology between cyanobacterial and higher plant nitrite reductases. *Plant Molecular Biology* **21**, 1201-1205.

Luque, I., Flores, E. & Herrero, A. (1994). Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *The EMBO Journal* **13**, 2862-2869.

Luque, I., Zabulon, G., Contreras, A. & Jean Houmard (2001). Convergence of two global transcriptional regulators on nitrogen induction of the stress-acclimation gene *nblA* in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Molecular Microbiology* **41**, 937-947.

Luque, I. & Forchhammer, K. (2008). Nitrogen Assimilation and C/N Balance Sensing. In *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Edited by A. Herrero & E. Flores: Caister Academic Press.

Maeda, S.-i. & Omata, T. (1997). Substrate-binding Lipoprotein of the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942 Involved in the Transport of Nitrate and Nitrite. *J Biol Chem* **272**, 3036-3041.

Maeda, S.-i., Badger, M. R. & Price, G. D. (2002). Novel gene products associated with NdhD3/D4-containing NDH-1 complexes are involved in photosynthetic CO₂ hydration in the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7942. *Molecular Microbiology* **43**, 425-435.

Maeda, S., Kawaguchi, Y., Ohe, T. & Omata, T. (1998). *cis*-Acting Sequences Required for NtcB-Dependent, Nitrite-Responsive Positive Regulation of the Nitrate Assimilation Operon in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology* **180**, 4080.

Marqués, S., Florencio, F. & Candau, P. (1992). Purification and characterization of the ferredoxin-glutamate synthase from the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6301. *European Journal of Biochemistry* **206**, 69-77.

McCarn, D. F., Whitaker, R. A., Alam, J., Vrba, J. M. & Curtis, S. E. (1988). Genes encoding the alpha, gamma, delta, and four F0 subunits of ATP synthase constitute an operon in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology* **170**, 3448-3458.

Meeks, J. C., Wolk, C. P., Thomas, J., Lockau, W., Shaffer, P. W., Austin, S. M., Chien, W. S. & Galonsky, A. (1977). The pathways of assimilation of ¹³NH₄⁺ by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. *J Biol Chem* **252**, 7894-7900.

Miller, A. G. & Espie, G. S. (1994). Photosynthetic metabolism of cyanate by the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. *Archives of Microbiology* **162**, 151-157.

- Mizuno, T., Kaneko, T. & Tabata, S. (1996).** Compilation of All Genes Encoding Bacterial Two-component Signal Transducers in the Genome of the Cyanobacterium, *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *DNA Res* **3**, 407-414.
- Montesinos, M. L., Muro-Pastor, A. M., Herrero, A. & Flores, E. (1998).** Ammonium/Methylammonium Permeases of a Cyanobacterium. Identification and analysis of three nitrogen-regulated *amt* genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* **273**, 31463-31470.
- Mullineaux, C., Tobin, M. & Jones, G. (1997).** Mobility of photosynthetic complexes in thylakoid membranes. *Nature* **390**, 421-424.
- Mullineaux, C. W. & Emlyn-Jones, D. (2005).** State transitions: an example of acclimation to low-light stress. *J Exp Bot* **56**, 389-393.
- Muro-Pastor, A. M., Herrero, A. & Flores, E. (2001a).** Nitrogen-Regulated Group 2 Sigma Factor from *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 Involved in Survival under Nitrogen Stress. *Journal of Bacteriology* **183**, 1090-1095.
- Muro-Pastor, A. M., Valladares, A., Flores, E. & Herrero, A. (2002).** Mutual dependence of the expression of the cell differentiation regulatory protein HetR and the global nitrogen regulator NtcA during heterocyst development. *Molecular Microbiology* **44**, 1377-1385.
- Muro-Pastor, A. M., Reyes, J. C. & Florencio, F. J. (2005).** Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynthesis research* **83**.
- Muro-Pastor, M., Reyes, J. & Florencio, F. (1996).** The NADP⁺-isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) is nitrogen regulated in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* **178**, 4070-4076.
- Myers, J., Graham, J. & Wang, R. (1980).** Light Harvesting in *Anacystis nidulans* Studied in Pigment Mutants. *Plant Physiology* **66**, 1144.
- Ninfa, A. J. & Atkinson, M. R. (2000).** PII signal transduction proteins. *Trends in Microbiology* **8**, 172-179.
- Ninfa, A. J. & Jiang, P. (2005).** PII signal transduction proteins: sensors of α -ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. *Current Opinion in Microbiology* **8**, 168-173.
- Nodop, A., Pietsch, D., Hocker, R., Becker, A., Pistorius, E. K., Forchhammer, K. & Michel, K.-P. (2008).** Transcript Profiling Reveals New Insights into the Acclimation of the Mesophilic Fresh-Water Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 to Iron Starvation. *Plant Physiol* **147**, 747-763.
- O'Gara, J. P., Eraso, J. M. & Kaplan, S. (1998).** A Redox-Responsive Pathway for Aerobic Regulation of Photosynthesis Gene Expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Journal of Bacteriology* **180**, 4044-4050.
- Ogawa, T. & Mi, H. (2007).** Cyanobacterial NADPH dehydrogenase complexes *Photosynthesis research* **93**, 69-77.

Ohkawa, H., Pakrasi, H. B. & Ogawa, T. (2000). Two Types of Functionally Distinct NAD(P)H Dehydrogenases in *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. *J Biol Chem* **275**, 31630-31634.

Oka, A., Sugisaki, H. & Takanami, M. (1981). Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *J Mol Biol* **147**, 217-226.

Omata, T., Andriesse, X. & Hirano, A. (1993). Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Molecular and General Genetics* **236**, 193-202.

Osanai, T., Sato, S., Tabata, S. & Tanaka, K. (2005). Identification of PamA as a PII-binding membrane protein important in nitrogen-related and sugar-catabolic gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* **280**, 34684-34690.

Paz-Yepes, J., Flores, E. & Herrero, A. (2003). Transcriptional effects of the signal transduction protein PII (*glnB* gene product) on NtcA-dependent genes in *Synechococcus* sp. PCC 7942. *FEBS letters* **543**, 42-46.

Paz-Yepes, J., Herrero, A. & Flores, E. (2007). The NtcA-Regulated *amtB* Gene Is Necessary for Full Methylammonium Uptake Activity in the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Journal of Bacteriology* **189**, 7791-7798.

Pearce, J., Leach, C. & Carr, N. (1969). The incomplete tricarboxylic acid cycle in the blue-green alga *Anabaena variabilis*. *J Gen Microbiol* **55**, 371-378.

Perelman, A., Uzan, A., Hacoheh, D. & Schwarz, R. (2003). Oxidative Stress in *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942: Various Mechanisms for H₂O₂ Detoxification with Different Physiological Roles. *Journal of Bacteriology* **185**, 3654-3660.

Pfannschmidt, T., Allen, J. F. & Oelmüller, R. (2001). Principles of redox control in photosynthesis gene expression. *Physiologia Plantarum* **112**, 1-9.

Podar, M., Eads, J. & Richardson, T. (2005). Evolution of a microbial nitrilase gene family: a comparative and environmental genomics study. *BMC Evolutionary Biology* **5**, 42-55.

Price, G. D., Maeda, S.-i., Omata, T. & Badger, M. R. (2002). Modes of active inorganic carbon uptake in the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7942. *Functional Plant Biology* **29**, 131-149.

Ramasubramanian, T. S., Wei, T. F. & Golden, J. W. (1994). Two *Anabaena* sp. strain PCC 7120 DNA-binding factors interact with vegetative cell- and heterocyst-specific genes. *Journal of Bacteriology* **176**, 1214-1223.

Reyes, J. & Florencio, F. (1994). A new type of glutamine synthetase in cyanobacteria: the protein encoded by the *glnN* gene supports nitrogen assimilation in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* **176**, 1260-1267.

Richaud, C., Zabulon, G., Joder, A. & Thomas, J.-C. (2001). Nitrogen or Sulfur Starvation Differentially Affects Phycobilisome Degradation and Expression of the *nblA* Gene in *Synechocystis* Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* **183**, 2989-2994.

- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. & Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of general microbiology* **111**, 1-61.
- Rubio, L., Herrero, A. & Flores, E. (1996). A cyanobacterial *narB* gene encodes a ferredoxin-dependent nitrate reductase. *Plant Molecular Biology* **30**, 845-850.
- Ruiz, D., Salinas, P., Lopez-Redondo, M. L., Cayuela, M. L., Marina, A. & Contreras, A. (2008a). Phosphorylation-independent activation of the atypical response regulator NblR. *Microbiology* **154**, 3002-3015.
- Salinas, P., Ruiz, D., Cantos, R., Lopez-Redondo, M., Marina, A. & Contreras, A. (2007). The regulatory factor SipA provides a link between NblS and NblR signal transduction pathways in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Molecular Microbiology* **66**, 1607-1619.
- Sambrock, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989). In: Ford N, Nolan C (eds) Molecular cloning—A laboratory manual: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sauer, J., Görl, M. & Forchhammer, K. (1999). Nitrogen starvation in *Synechococcus* PCC 7942: involvement of glutamine synthetase and NtcA in phycobiliprotein degradation and survival. *Archives of Microbiology* **172**, 247-255.
- Sauer, J., Dirmeier, U. & Forchhammer, K. (2000). The *Synechococcus* Strain PCC 7942 *glnN* Product (Glutamine Synthetase III) Helps Recovery from Prolonged Nitrogen Chlorosis. *Journal of Bacteriology* **182**, 5615-5619.
- Sauer, J., Schreiber, U., Schmid, R., Volker, U. & Forchhammer, K. (2001). Nitrogen Starvation-Induced Chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942. Low-Level Photosynthesis As a Mechanism of Long-Term Survival. *Plant Physiology* **126**, 233-243.
- Schaefer, M. R. & Golden, S. S. (1989). Differential expression of members of a cyanobacterial *psbA* gene family in response to light. *Journal of Bacteriology* **171**, 3973-3981.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-379.
- Schaller, G. E., Ladd, A. N., Lanahan, M. B., Spanbauer, J. M. & Bleecker, A. B. (1995). The Ethylene Response Mediator ETR1 from Arabidopsis Forms a Disulfide-linked Dimer. *J Biol Chem* **270**, 12526-12530.
- Schär, J., Sickmann, A. & Beier, D. (2005). Phosphorylation-Independent Activity of Atypical Response Regulators of *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology* **187**, 3100-3109.
- Schendel, F., Mueller, E., Stubbe, J., Shiau, A. & Smith, J. (1989). Formylglycinamide ribonucleotide synthetase from *Escherichia coli*: cloning, sequencing, overproduction, isolation, and characterization. *Biochemistry* **28**, 2459-2471.
- Schopfer, P., Brennicke, A. & Mohr, H. (1999). *Pflanzenphysiologie*: Springer.

- Schwarz, R. & Grossman, A. (1998).** A response regulator of cyanobacteria integrates diverse environmental signals and is critical for survival under extreme conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 11008-11013.
- Schwarz, R. & Forchhammer, K. (2005).** Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network of cellular responses. *Microbiology* **151**, 2503-2514.
- Seki, A., Hanaoka, M., Akimoto, Y., Masuda, S., Iwasaki, H. & Tanaka, K. (2007).** Induction of a Group 2 {sigma} Factor, RPOD3, by High Light and the Underlying Mechanism in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Biol Chem* **282**, 36887-36894.
- Sendersky, E., Lahmi, R., Shaltiel, J., Perelman, A. & Schwarz, R. (2005).** NblC, a novel component required for pigment degradation during starvation in *Synechococcus* PCC 7942. *Molecular Microbiology* **58**, 659-668.
- Shestakov, S. & Khyen, N. (1970).** Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Molecular and General Genetics MGG* **107**, 372-375.
- Shibata, M., Ohkawa, H., Kaneko, T., Fukuzawa, H., Tabata, S., Kaplan, A. & Ogawa, T. (2001).** Distinct constitutive and low-CO₂-induced CO₂ uptake systems in cyanobacteria: Genes involved and their phylogenetic relationship with homologous genes in other organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 11789-11794.
- Smith, C. S., Morrice, N. A. & Moorhead, G. B. (2004).** Lack of evidence for phosphorylation of *Arabidopsis thaliana* PII: implications for plastid carbon and nitrogen signaling. *Biochim Biophys Acta* **1699**, 145-154.
- Stanier, R. Y. & Cohen-Bazire, G. (1977).** Phototrophic Prokaryotes: The Cyanobacteria. *Annual Review of Microbiology* **31**, 225-274.
- Stelljes, C. & Koenig, F. (2007).** Specific Binding of D1 Protein Degradation Products to the psbAI Promoter in *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology* **189**, 1722-1726.
- Sterner, D. E. & Berger, S. L. (2000).** Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 435-459.
- Suzuki, I., Sugiyama, T. & Omata, T. (1993).** Primary Structure and Transcriptional Regulation of the Gene for Nitrite Reductase from the Cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol* **34**, 1311-1320.
- Suzuki, I., Horie, N., Sugiyama, T. & Omata, T. (1995).** Identification and characterization of two nitrogen-regulated genes of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942 required for maximum efficiency of nitrogen assimilation. *Journal of Bacteriology* **177**, 290-296.
- Takatani, N., Kobayashi, M., Maeda, S. & Omata, T. (2006).** Regulation of Nitrate Reductase by Non-Modifiable Derivatives of PII in the Cells of *Synechococcus elongatus* Strain PCC 7942. *Plant & Cell Physiology* **47**, 1182-1186.

- Tandeau de Marsac , N. (1983).** Phycobilisomes and complementary chromatic adaptation in cyanobacteria. *Bulletin de l'Institut Pasteur* **81**, 201-254.
- Tandeau de Marsac, N. & Houmard, J. (1993).** Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiology Letters* **104**, 119-189.
- Tanigawa, R., Shirokane, M., Maeda, S.-i., Omata, T., Tanaka, K. & Takahashi, H. (2002).** Transcriptional activation of NtcA-dependent promoters of *Synechococcus* sp. PCC 7942 by 2-oxoglutarate in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 4251-4255.
- Taylor, B. L. & Zhulin, I. B. (1999).** PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 479-506.
- Tichy, M. & Vermaas, W. (1999).** In Vivo Role of Catalase-Peroxidase in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* **181**, 1875-1882.
- Toro-Roman, A., Wu, T. & Stock, A. M. (2005).** A common dimerization interface in bacterial response regulators KdpE and TorR. *Protein Sci* **14**, 3077-3088.
- Tsuzuki, M., Aiba, H. & Mizuno, T. (1994).** Gene activation by the Escherichia coli positive regulator, OmpR: Phosphorylation-independent mechanism of activation by an OmpR mutant. *Journal of Molecular Biology* **242**, 607-613.
- Ulmasov, T., Hagen, G. & Guilfoyle, T. J. (1999).** Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *The Plant Journal* **19**, 309-319.
- Valladares, A., Flores, E. & Herrero, A. (2008).** Transcription activation by NtcA and 2-Oxoglutarate of three genes involved in heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology* **190**, 6126-6133.
- van Thor, J., Mullineau, C., Matthijs, H. & Hellingwerf, K. (1998).** Light harvesting and state transition in cyanobacteria. *Botanica acta* **111**, 430-443.
- van Waasbergen, L. G., Dolganov, N. & Grossman, A. R. (2002).** *nbIS*, a Gene Involved in Controlling Photosynthesis-Related Gene Expression during High Light and Nutrient Stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Journal of Bacteriology* **184**, 2481-2490.
- Vázquez-Bermúdez, M., Antonia, H. & Enrique, F. (2002a).** 2-Oxoglutarate increases the binding affinity of the NtcA (nitrogen control) transcription factor for the *Synechococcus glnA* promoter. *FEBS letters* **512**, 71-74.
- Vázquez-Bermúdez, M. F., Flores, E. & Herrero, A. (2002b).** Analysis of binding sites for the nitrogen-control transcription factor NtcA in the promoters of *Synechococcus* nitrogen-regulated genes. *Biochimica et biophysica acta* **1578**, 95-98.
- Vázquez-Bermúdez, M. F., Paz-Yepes, J., Herrero, A. & Flores, E. (2002c).** The NtcA-activated *amt1* gene encodes a permease required for uptake of low concentrations of ammonium in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Microbiology* **148**, 861-869.

Vega-Palas, M., Madueño, F., Herrero, A. & Flores, E. (1990). Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology* **172**, 643-647.

Vega-Palas, M. A., Flores, E. & Herrero, A. (1992). NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators. *Molecular Microbiology* **6**, 1853-1859.

Vermaas, W. (2001). Photosynthesis and respiration in cyanobacteria. *Encyclopedia of Life Sciences* **1**.

Walsh, C. (2005). *Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory*: Roberts & Co.

Wellen, D. (2008). Untersuchung des globalen response regulators NblR in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. In *Institut für Mikro- und Molekularbiologie*. Gießen: Justus-Liebig-Universität.

Westwood, I. M. & Sim, E. (2007). Kinetic characterization of arylamine N-acetyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Biochemistry* **8**, 1-14.

Whitton, B. & Potts, M. (2000). Introduction to the cyanobacteria. *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*, 1–11.

Wittschieben, B., Otero, G., Bizemont, T. d. & other authors (1999). A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Molecular Cell* **4**, 123-128.

Wolk, C. P., Thomas, J., Shaffer, P. W., Austin, S. M. & Galonsky, A. (1976). Pathway of nitrogen metabolism after fixation of ¹³N-labeled nitrogen gas by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. *J Biol Chem* **251**, 5027-5034.

Xu, Y., Cheah, E., Carr, P., van Heeswijk, W., Westerhoff, H., Vasudevan, S. & Ollis, D. (1998). GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. *Journal of Molecular Biology* **282**, 149-165.

Xu, Y., Carr, P., Clancy, P., Garcia-Dominguez, M., Forchhammer, K., Florencio, F., de Marsac, N., Vasudevan, S. & Ollis, D. (2003). The structures of the PII proteins from the cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7942 and *Synechocystis* sp. PCC 6803. *logo* **59**, 2183-2190.

Yamanaka, G. & Glazer, A. N. (1980). Dynamic Aspects of Phycobilisome Structure. *Archives of Microbiology* **124**, 39-47.

Yan, D., Cho, H., Hastings, C., Igo, M., Lee, S., Pelton, J., Stewart, V., Wemmer, D. & Kustu, S. (1999). Beryll fluoride mimics phosphorylation of NtrC and other bacterial response regulators, pp. 14789-14794: National Acad Sciences.

Yoshihara, S., Geng, X. & Ikeuchi, M. (2002). *pilG* Gene Cluster and Split *pilL* Genes Involved in Pilus Biogenesis, Motility and Genetic Transformation in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **43**, 513-521.

Zhang, C., Jang, J., Sakr, S. & Wang, L. (2005). Protein Phosphorylation on Ser, Thr and Tyr Residues in Cyanobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**, 154-166.

7. Abkürzungen

A	Absorption	m...	milli...
Abb.	Abbildung	min	Minute
ATP	Adenosintriphosphat	MOPS	3-Morpholino-1-Propansulfonsäure
bp	Basenpaare	NaCl	Natriumchlorid
BSA	Rinderserumalbumin	NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
bzw.	beziehungsweise	nm	Nanometer
°C	Grad Celcius	NP-40	Nonidet P-40
ca.	circa	OD_x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
Chla	Chlorophyll a	PAGE	Polyacrylamid-gelelektrophorese
Cm	Chloramphenicol	PBS	Phycobilisomen
Cpm	Zerfall pro Minute	PCC	Pasteur Culture Collection
d	Tag	PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure	pl	isoelektrischer Punkt
dNTP	Desoxyribonukleotid-triphosphat	PMSF	Phenylmethylsulfonyl-fluorid
DTT	Dithiothreitol	PS	Photosystem
E	Einstein (mol x Photonen s ⁻¹ m ²)	r	Resistenz
<i>E. coli</i>	Escherichia coli	RNA	Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetra-essigsäure	rpm	Umdrehungen pro min
et al.	Lat. et alii und andere	RT	Raumtemperatur
Eßl.	Esslöffel	RU	<i>Resonance Units</i>
ETR	Elektronentransportrate	RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
g	Gramm oder Erdbeschleunigung	s	Sekunde
GOGAT	Glutamat-Synthase	SDS	Natriumdodecylsulfat
GS	Glutamin-Synthetase	<i>S. elongatus</i>	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942
h	Stunde	SPR	surface plasmon resonance
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure	<i>Synechocystis</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
IEF	Isoelektrische Fokussierung	Tab.	Tabelle
IF	Inaktivierungsfaktoren	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galakto-pyranosid	TBS	Tris-buffered-saline
kan	Kanamycin	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
kDa	kilo-Dalton	UV	Ultraviolett
l	Liter	V	Volt
LB	Luria-Bertani	v/v	Volumen/Volumen
µ...	mikro...	Wt	Wildtyp
µCi	Mikrocurie (Einheit der Radioaktivität)	z.B.	zum Beispiel
M	Molar		

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. K. Forchhammer für die Möglichkeit dieser Doktorarbeit, der Überlassung des Themas und der intensiven, fachlich sehr guten Betreuung der Arbeit bedanken. Er hat diese Arbeit mit seinen Ideen und Erfahrungen und vielen fruchtbaren Diskussionen immer wieder vorangetrieben.

Vielen Dank an Frau Prof. Dr. Annegret Wilde für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau PD. Dr. Iris Maldener für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und Motivation bei meiner Arbeit.

Ein Dankeschön geht an Dr. Anke Nodop für die großartige Hilfe bei den Mikroarrays.

Bei Dr. Rakefet Schwarz und ihrer Arbeitsgruppe möchte ich mich dafür bedanken, dass ich in einem Gastaufenthalt in ihrer Arbeitsgruppe den israelischen Weg des Forschens und Lebens kennenlernen durfte.

Dem „Gießener“ Team Ulrike, Carmen und Elvira danke ich für das nette Arbeitsklima. Ulrike: Danke für deine magischen Klonierungshilfen. Nicole, Miri und Annette möchte ich für die enge Zusammenarbeit, den Ideenaustausch, interessanten Diskussion und heiteren Stunden herzlich danken. Miri: Vielen Dank für die aufmunternden E-Mails und Telefonate!

Für die nette Aufnahme in das Laborleben in Tübingen danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus Hantke, Marianne, Silke, Beate, Christina und Claudia. Beate: Danke fürs „Schuften“ beim „Shiften“. Michaela: Danke für die Unterstützung im Verwaltungschaos. Suse, Sascha, Iris, Sabine und Josef möchte ich herzlich für die Unterstützung im Labor, die Motivation und die netten und lustigen Stunden danken.

Danke Miri und Suse für die sorgfältigen Korrekturen meiner Arbeit!

Auch möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die mich nicht nur tatkräftig unterstützt haben, sondern mich stets auch aufbauten. Dankeschön Monika, die immer ein Händchen für die richtige Zeit zum Telefonieren hat und für die erforderliche Abwechslung sorgt.

Auch geht mein großer Dank an meine Eltern, die mich stets bestärkt und unterstützt haben, wenn es mal schwierig wurde.

Vielen Dank!

Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Tübingen, März 2009

(Grit Rasch)